

**mgr farm. Piotr Celejewski-Marciniak**

Genotypowanie oraz charakterystyka wybranych plazmidów  
i integronów klinicznych szczepów pałeczek Gram-ujemnych  
z rodzaju *Serratia*

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska *Marta Wróblewska*  
Promotor pomocniczy: dr n. biol. Renata Wolinowska *R. Wolinowska*

Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej  
Wydział Lekarsko-Stomatologiczny  
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

*Piotr  
Celejewski-Marciniak*

## Streszczenie w języku polskim

Gram-ujemne pałeczki z rodzaju *Serratia* są nadal niewystarczająco poznanym przedstawicielem rzędu *Enterobacterales*. Bakterie te były sklasyfikowane w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*, lecz w 2016 r. nastąpiła zmiana taksonomii, zgodnie z którą rodzaj *Serratia* należy obecnie do nowo utworzonej *Yersiniaceae*. Początkowo bakterie *Serratia* spp. były uważane za niegroźne drobnoustroje środowiskowe, jednak w XX wieku rozprzestrzeniły się w środowisku szpitalnym wywołując u hospitalizowanych pacjentów różnego rodzaju zakażenia obejmujące m.in. układ moczowy, skórę i tkankę podskórną, ośrodkowy układ nerwowy (OUN), czy prowadząc do sepsy.

Z uwagi na liczbę izolacji od ludzi oraz oporność na antybiotyki, najważniejszym gatunkiem rodzaju *Serratia* jest *Serratia marcescens*. Pierwsze udokumentowane przypadki zakażeń o tej etiologii u ludzi stwierdzono na terenie Wielkiej Brytanii na początku XX wieku, a pierwszą epidemię szpitalną opisano w latach sześćdziesiątych XX wieku także na terenie Wielkiej Brytanii. Obecnie *S. marcescens* bezspornie jest zaliczana do drobnoustrojów wywołujących oportunistyczne zakażenia u ludzi, zwłaszcza u noworodków i małych dzieci. Grupą szczególnie narażoną na te infekcje są osoby z obniżoną odpornością i/lub otrzymujące antybiotykoterapię o szerokim spektrum.

Głównym celem niniejszej pracy było utworzenie kolekcji izolatów *Serratia* spp. oraz ich szczegółowa charakterystyka obejmująca analizę zarówno cech fenotypowych, jak i genotypowych.

Materiał do badań stanowiło 120 klinicznych szczepów zidentyfikowanych jako *Serratia marcescens*, uzyskanych z siedmiu laboratoriów mikrobiologicznych z Warszawy oraz Otwocka. Po ponownej identyfikacji trzema metodami: MALDI-TOF MS, Vitek 2 Compact oraz API 20E, ostatecznie do gatunku *S. marcescens* zaliczono 103 izolaty, 7 – do *S. liquefaciens* oraz po jednym do *S. fonticola* i *S. ureilytica*.

Poza weryfikacją identyfikacji klinicznych szczepów *Serratia* spp., w ramach charakterystyki fenotypowej badanych izolatów wykonano oznaczenie lekowrażliwości na wybrane antybiotyki i inne chemioterapeutyki oraz metodą dwóch krążków (DDST) wykrywano najważniejsze mechanizmy oporności na antybiotyki. Fenotyp ESBL potwierdzono u 18 szczepów, a wytwarzanie karbapenemaz typu MBL – u dwóch.

Szczegółowa charakterystyka sekwencji nukleotydowych kodujących  $\beta$ -laktamazy CTX-M wykazała dominujący udział typu CTX-M-15, wykryty u ponad 75% szczepów ESBL-dodatnich. Po raz pierwszy na świecie opisano nowy wariant  $\beta$ -laktamazy - CTX-M-221 - będący hybrydą CTX-M-19 oraz CTX-M-3 (szczep nr 120). Unikatowa sekwencja nukleotydowa *bla*<sub>CTX-M-221</sub> została zdeponowana w GenBank NCBI pod numerem MH538139.

Genotypowanie (obejmujące metody RAPD, PFGE oraz analizę plazmidowego DNA) wykazało wysokie zróżnicowanie kolekcji szczepów z rodzaju *Serratia*, objętych niniejszym badaniem. Analiza dendrogramów powstałych w wyniku zastosowania metody PFGE wyodrębniło 83 różnych profili wśród 106 przeanalizowanych szczepów. Analiza profili plazmidowych potwierdziła obecność plazmidów różnej wielkości. Najliczniejszą grupę stanowiły plazmidy zaliczane do grupy niezgodności IncL/M, których występowanie związane było z wytwarzaniem  $\beta$ -laktamaz typu ESBL CTX-M.

W kolekcji szczepów objętych niniejszym badaniem potwierdzono obecność sekwencji DNA kodującej geny integrazy klasy pierwszej, drugiej oraz trzeciej. Szczegółowa analiza sekwencji DNA integronów wykazała w badanych szczepach dominujący udział genów warunkujących oporność na aminoglikozydy. Po raz pierwszy na świecie wykryto unikatową, nieopisaną dotąd na świecie sekwencję nukleotydową integronu klasy trzeciej zlokalizowanego w plazmidzie pPCMI3 (szczep nr 89), którą zdeponowano w GenBank NCBI pod numerem MH569711. Do GenBank NCBI zgłoszono także sekwencję nukleotydową plazmidu pPM120-2, która uzyskała unikatowy numer MH569712.

Uzyskane wyniki pozwoliły na obszerną charakterystykę klinicznych szczepów *Serratia* spp. zgromadzonych w ramach nowo utworzonej kolekcji oraz potwierdziły konieczność stałego monitorowania izolatów pochodzących od hospitalizowanych chorych. Sekwencjonowanie DNA wybranych plazmidów i integronów dostarczyło unikatowych danych (pierwsze na świecie wykrycie fuzyjnej  $\beta$ -laktamazy CTX-M-221 będącej hybrydą CTX-M-19 oraz CTX-M-3) oraz poszerzyło wiedzę o profilach oporności klinicznych szczepów *Serratia* spp. na wybrane antybiotyki i inne chemioterapeutyki.