

# Fenotypowa i genomowa analiza rezystencji oraz badanie zjawiska heterogennej oporności w wielolekoopornych klinicznych izolatach *Enterobacter* spp.

Jakub Kalinowski

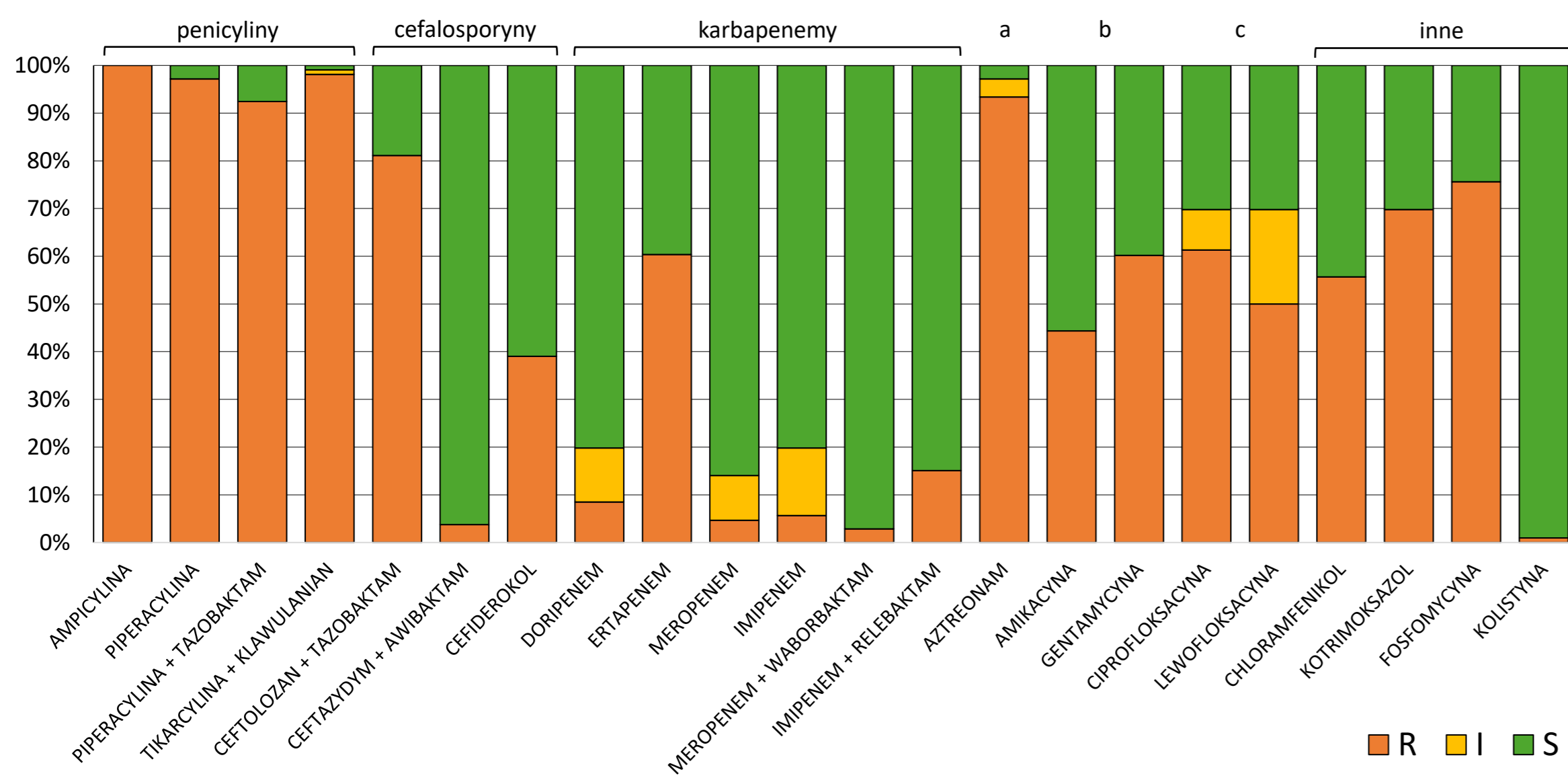
Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem i bezpośrednią opieką: dr hab. n. med. i n. o zdr. Kseni Szymanek-Majchrzak

## 1. WPROWADZENIE

*Enterobacter* spp. znajdują się w czołówce krytycznych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne (grupa ESKAPE), a narastająca oporność na antybiotyki, zwłaszcza z grupy karbapenemów, stawia je w pierwszej trójce czynników infekcyjnych uznanych przez WHO za szczególne zagrożenie dla zdrowia publicznego (WHO PPL, 2024). Narastająca antybiotykooporność wśród szczepów *Enterobacter* spp., wiąże się z wydłużonym pobytem pacjentów w placówkach służby zdrowia, wyższymi kosztami leczenia i większą śmiertelnością. Pomimo tego, w porównaniu do innych pałeczek *Enterobacteriales*, wiedza na temat epidemiologii *Enterobacter* spp. oraz mechanizmów prowadzących do niepowodzeń terapeutycznych zakażeń z ich udziałem, jest wciąż ograniczona.

## 2. CELE PRACY

- Kompleksowa charakterystyka profilu oporności na antybiotyki, ze szczególnym uwzględnieniem karbapenemów, kolekcji klinicznych izolatów *Enterobacter* spp. pochodzących z Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Warszawie
- Badanie mechanizmów oporności na karbapenemy - analiza fenotypowa i genotypowa szczepów
- Analiza genomowa rezystencji oraz powiązanego z nim mobilomu wyselekcjonowanego izolatu o fenotypie XDR
- Badanie występowania zjawiska heterogennej oporności i ocena stabilności cechy

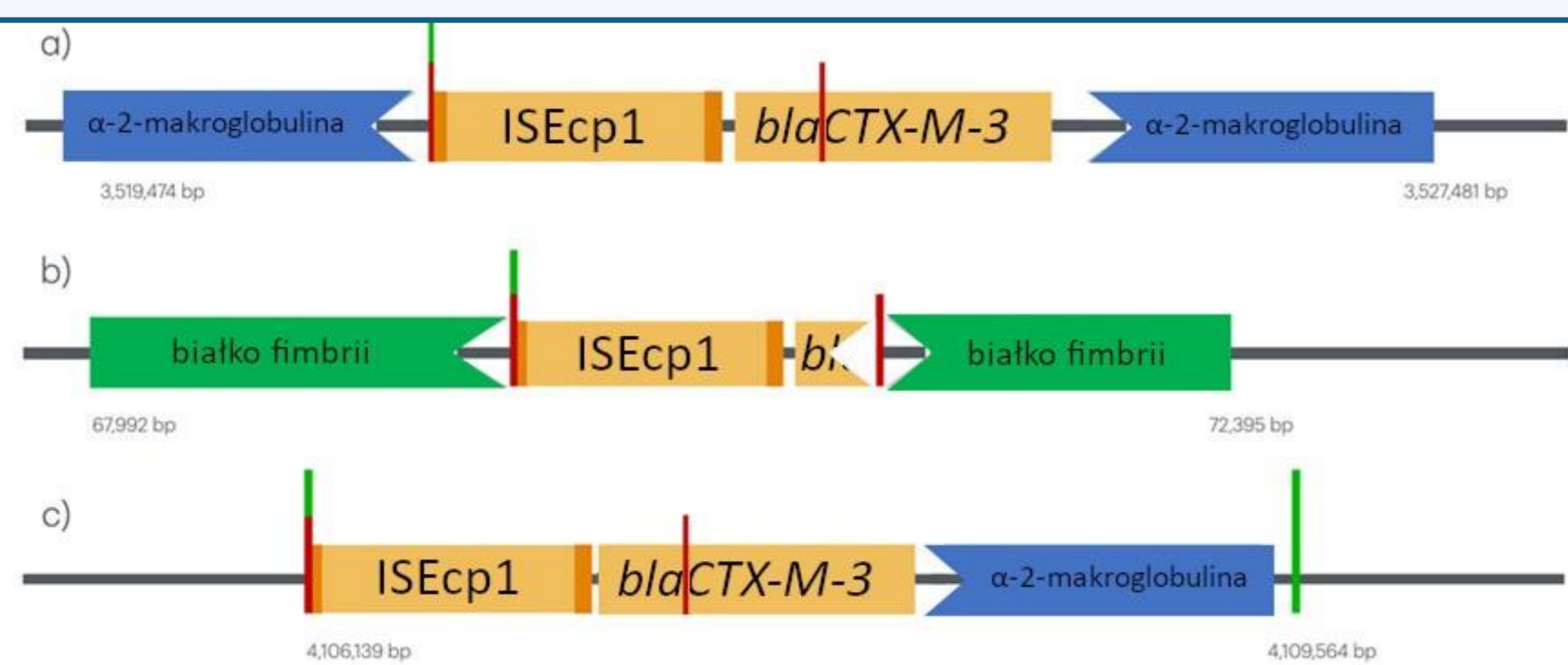


Rycina 2 Wyniki antybiogramów podstawowych. R – oporność, I – wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji, S – wrażliwość; a – monobaktamy, b – aminoglikozydy, c – chinolony. Na rycinie nie uwzględniono antybiotyków, które były używane w testach ESBL (amoksylicyna z klawulanianem, cefazydym, cefotaksym, cefepim)

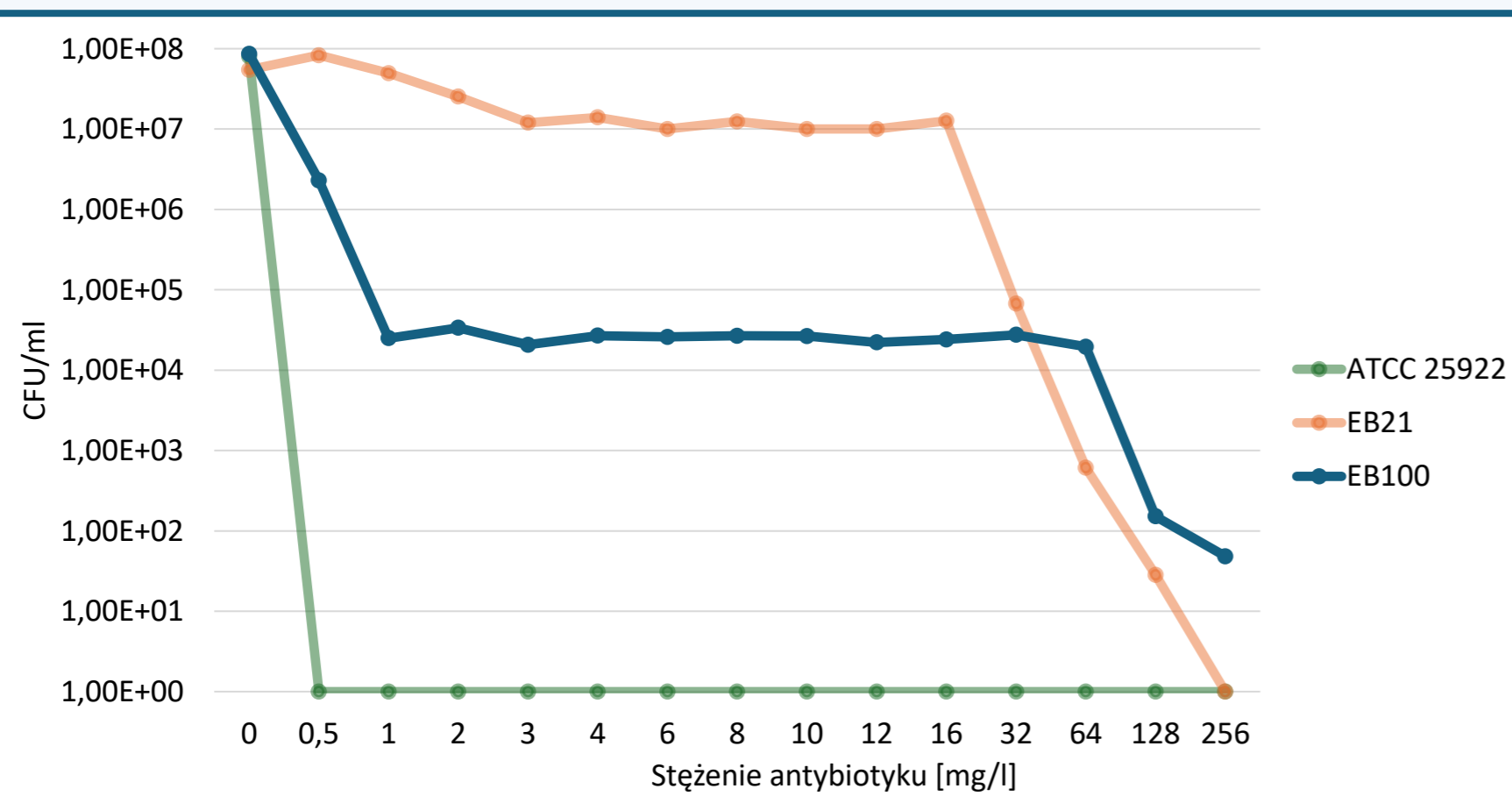
## 4.2 WYNIKI

Obecność wielokrotnych kopii genu *bla*CTX-M-3 w modułach TMos najprawdopodobniej wpłynęła na podwyższenie poziomu ekspresji β-laktamazy, poszerzając poziom i spektrum oporności na antybiotyki β-laktamowe. Ponadto insercja TMos w sekwencji kodujące inne białka mogła modulować wirulencję szczepu EB21 (Rycina 4).

W populacji szczepu *E. cloacae* EB100 zaobserwowano zjawisko heterooporności na ceftazydym: około 0,01% komórek przeżywało ekspozycję na stężenia do 64 mg/l antybiotyku, a około 0,00001% na 128–256 mg/l. Cecha ta była stabilna, co sugeruje, że mechanizm heterooporności u EB100 nie generuje znacznego kosztu metabolicznego dla komórki i dzięki temu może utrzymywać się w populacji (Rycina 5).



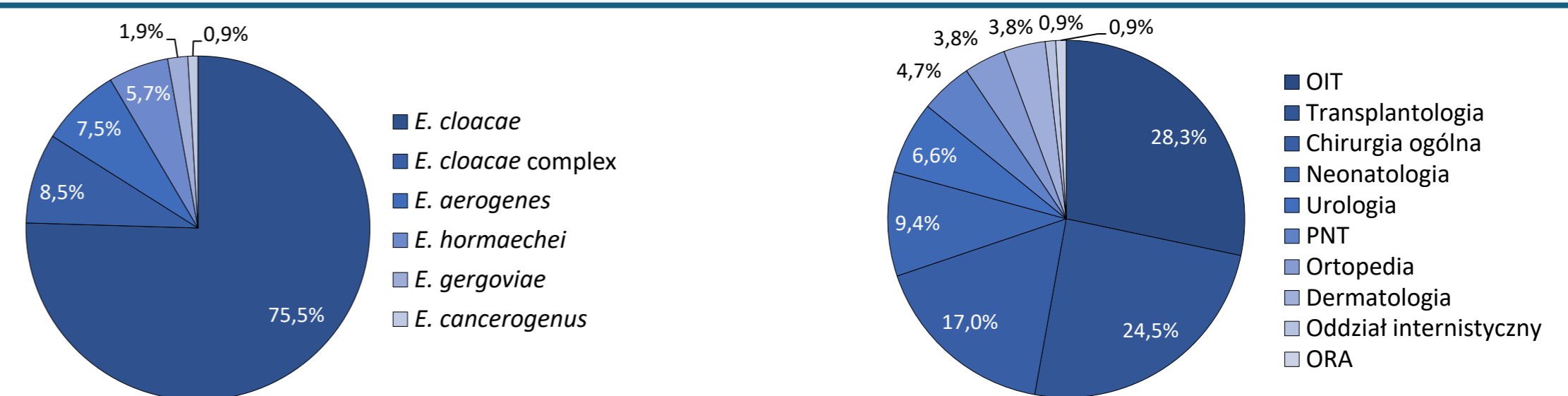
Rycina 4 Rearanżacje genetyczne wewnątrzchromosomowe w genomie *E. hormaechei* EB21, zachodzące przy udziale ISEcp1-zależnych modułów transpozycyjnych, TMos, prowadzące do zwielokrotnienia liczby kopii i zwiększenia poziomu ekspresji genu *bla*CTX-M-3 oraz rozbięcia/inaktywacji innych genów strukturalnych



Rycina 5 Przebieg krzywej populacyjnej, w zależności od wzrastającego stężenia ceftazydymu na podłożu MHE, dla szczepów: ATCC25922, EB21 i EB100

## 3. METODYKA

- Oznaczanie antybiotyku szczepów metodami: dyfuzyjno-krążkową, E-Test, mikrocieńców w podłożu stałym i płynnym wg EUCAST
- Wykrywanie karbapenemaz metodami fenotypowymi: klasycznymi (DDST-EDTA, CDT, TEM) i specjalnymi (mCIM, eCIM)
- Analiza genetyczna: detekcja genów kodujących karbapenemazy (amplifikacja DNA i rozdział elektroforetyczny)
- Analiza genomowa – sekwencjonowanie NGS II i III gen. (MiSeq Illumina, USA; GridION, Oxford Nanopore Technologies, UK), analizy bioinformatyczne
- Analiza populacyjna, PAP; test stabilności cechy



Rycina 1 Udział procentowy poszczególnych gatunków *Enterobacter* spp. stanowiących materiał badania wraz z rozkładem procentowym pochodzenia analizowanych szczepów, według oddziałów

## 4.1 WYNIKI

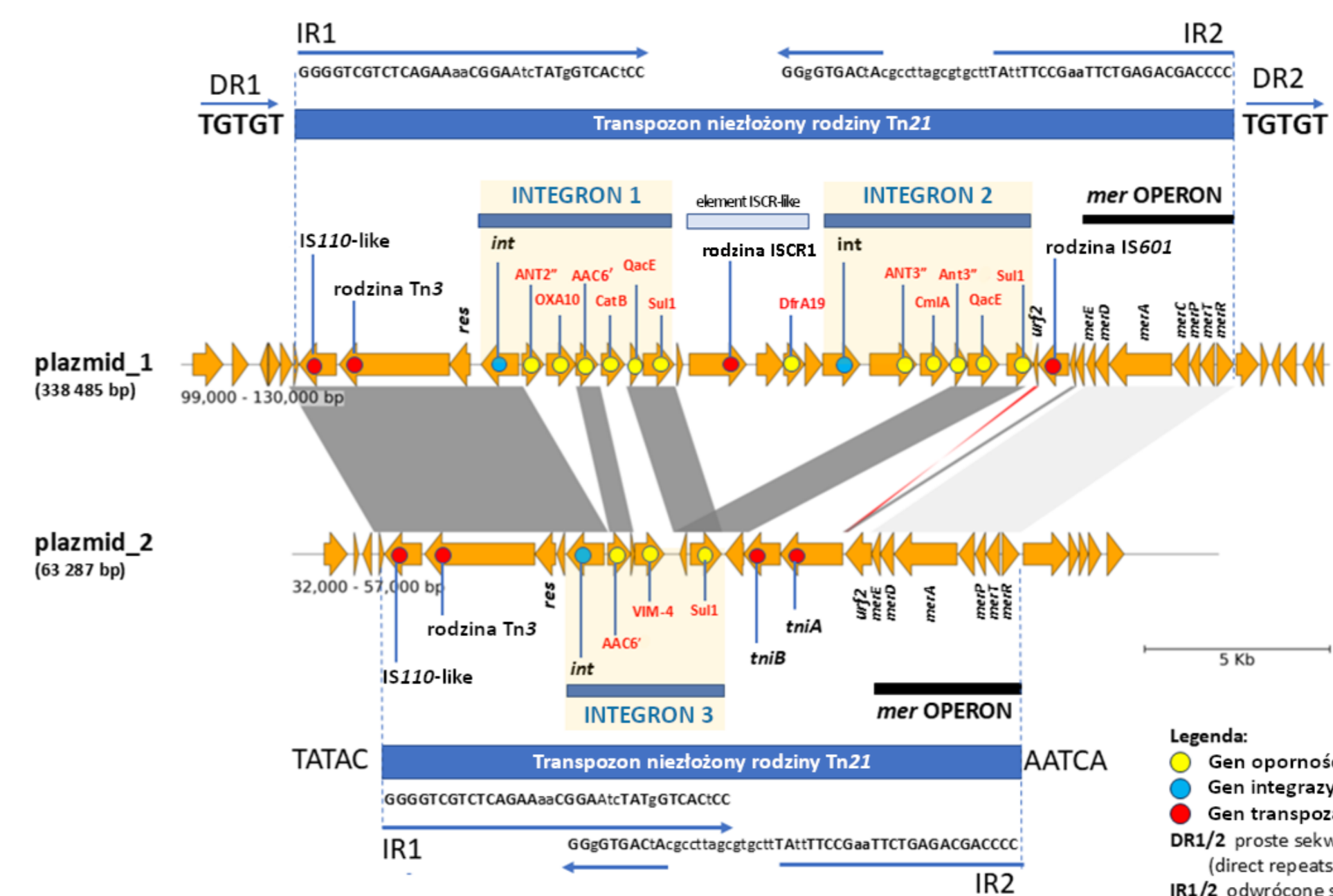
Wśród 106 analizowanych klinicznych izolatów *Enterobacter* spp. z UCK WUM, 90,6% należało do kompleksu *Enterobacter cloacae*, wśród nich dominowały gatunki *E. cloacae* (75,5%) oraz *E. hormaechei* (5,7%) (Rycina 1). Wszystkie badane izolaty wykazywały fenotyp wielolekooporny (MDR) w panelu 26 antybiotyków (Rycina 2). Spośród nich 79% produkowało β-laktamazy ESBL, a 47% miało fenotyp ESAC.

Standardowe testy fenotypowe na obecność karbapenemaz okazały się mało wiarygodne dla *Enterobacter* spp.: testy wykrywające KPC i OXA-48 dawały odpowiednio 100% i 77% wyników fałszywie pozytywnych. Wśród szczepów niewrażliwych na karbapenemy jedynie w 4 przypadkach (6%) potwierdzono obecność karbapenemaz (fenotypowo i genetycznie).

Hiperoporny szczep *E. hormaechei* EB21, pochodzący z krwi pacjenta OIT i wrażliwy fenotypowo jedynie na kolistynę, poddano sekwencjonowaniu całogenomowemu. Ustalono, że genom szczepu ma wyjątkowo duży rozmiar (>5,35 Mb; 5284 geny) i składa się z trzech replikonów, w tym ~338,5-kb megaplazmidu pEB21\_1 (grupa IncHI2/IncHI2A).

Niezwykle bogaty rezystom szczepu EB21 obejmował 24 geny oporności, z czego 21 (87,5%) zlokalizowanych było na elementach ruchomych (plazmidach, elementach transpozycyjnych i integrujących w DNA; łącznie 18 genów na plazmidach, w tym 15 na megaplazmidzie pEB21\_1). Większość plazmidowych genów oporności EB21 była zgrupowana w integronach klasy 1, stanowiących część transpozonów z rodziny Tn21-like (Rycina 3).

Szczegółowa analiza genomu EB21 ujawniła też nietypowe elementy transpozycyjne, których nie wykrywają standardowe algorytmy. Zidentyfikowano m.in.: zależny od IS26, pseudotranspozon złożony (PCT) niosący gen *catA2*; moduł transpozycyjny typu ISCR (zależny od IS91) z genem *dfrA19*; oraz trzy chromosomalne moduły transpozycyjne (TMos) powiązane z insercją *ISEcp1* (każdy niosący gen *bla*CTX-M-3).



Rycina 3 Struktura i organizacja genetyczna kluczowych genów oporności na antybiotyki i detergenty oraz ruchomych elementów genetycznych, MGE (integronów klasy 1, Int1, i elementów transpozycyjnych, TE) w genomie szczepu *E. hormaechei* EB21

## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- W rutynowej diagnostyce *Enterobacter* spp. należy zweryfikować stosowane metody wykrywania karbapenemaz. Zaleca się potwierdzanie produkcji karbapenemaz metodami o wysokiej wiarygodności, takimi jak mCIM/eCIM
- Identyfikacja w genomie szczepu EB21 niestandardowych elementów transpozycyjnych i nietypowych mechanizmów oporności, niewykrywalnych przez automatyczne narzędzia bioinformatyczne, podkreśla konieczność dalszych, pogłębionych badań w tym zakresie
- Integrony klasy 1, stanowiące część niezłożonych transpozonów z rodziny Tn21, mogą pełnić funkcję „pułapek genowych” oraz rusztowania genetycznego, umożliwiając akumulację, różnorodność i wysoką dynamikę translokacji wychwyconych genów oporności na antybiotyki
- Zdolność *Enterobacter* spp. do akumulacji i transferu wielu genów oporności podkreśla potrzebę monitorowania molekularnego tych patogenów oraz racjonalnego stosowania antybiotyków, aby ograniczyć presję selekcyjną
- Obserwacja stabilnych subpopulacji heteroopornych wskazuje, że pomimo oznaczonej *in vitro* wrażliwości, leczenie przeciwdrobnoustrojowe w warunkach klinicznych może zakończyć się niepowodzeniem terapeutycznym