Uniwersytet Wrocławski

Gabriela Cieniuch

Charakterystyka wybranych czynników wirulencji odzwierzęcych pałeczek z rodzaju *Serratia*

Rozprawa doktorska

wykonana na Wydziale Nauk Biologicznych,
w Zakładzie Mikrobiologii
pod kierunkiem promotora
prof. dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej
oraz promotora pomocniczego
dr inż. Agnieszki Korzeniowskiej-Kowal

Wrocław, 2023

Składam podziękowania promotorowi pracy, prof. dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej, za opiekę merytoryczną i cenne uwagi w procesie pisania rozprawy doktorskiej.

Promotorowi pomocniczemu, dr inż. Agnieszce Korzeniowskiej-Kowal, składam specjalne podziękowanie za opiekę merytoryczą w trakcie realizacji pracy doktorskiej i w procesie przygotowania rozprawy doktorskiej, za wsparcie w trudnych momentach, za wszelkie wskazówki i cenne uwagi, za nieustanną i nieocenioną pomoc, możliwość nieustannych konsultacji oraz za ciepłe przyjęcie mnie do zespołu Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów.

Dziękuję prof. dr hab. Jarosławowi Bystroniowi, za współpracę podczas pozyskiwania materiału do badań.

Zespołowi Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów dziękuję za wsparcie i przyjazną atmosferę pracy.

Rodzinie dziękuję za wsparcie, motywację do spełniania moich marzeń oraz niekończącą się wiarę w moje możliwości.

Współprace

Realizowanie niniejszej pracy doktorskiej możliwe było dzięki następującym współpracom naukowym Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego:

Zakład Mikrobiologii Żywności i Higieny Przetwórstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Jarosław Bystroń
dr Katarzyna Morka

Polska Kolekcja Mikroorganizmów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

dr inż. Agnieszka Korzeniowska-Kowal
mgr Anna Wzorek

Spis treści

1. Pałeczki z rodzaju *Serratia* ... 15
2. Chorobotwórczość pałeczek *Serratia* sp. wobec ludzi ... 16
2.1. Nosicielstwo i chorobotwórczość pałeczek *Serratia* sp. wobec zwierząt 22
2.2. Zwierzęta źródłem infekcji *Serratia* sp. ... 26
3. Antybiotykooporność pałeczek *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens* . 27
3.1. Mechanizmy oporności na antybiotyki pałeczek z rodzaju *Serratia* ... 30
4. Czynniki wirulencji pałeczek *Serratia sp.* ... 31
4.1. Toksyna hemolityczna ShlA ... 32
4.2. Fosfolipaza A1 (PhlA) ... 33
4.3. Lipopolisacharyd (LPS) ... 34
4.4. Fimbrie ... 35
4.5. Regulator wirulencji FlhCD ... 36
4.6. Proteazy ... 36
4.7. Deoksyrybonukleaza, lipaza, żelatynaza ... 37
5. Wyczuwalność liczebności bakterii (*ang. Quorum sensing*) u *Serratia* sp. ... 38
6. Oporność pałeczek *Serratia* sp. na działanie ludzkiej surowicy ... 38
7. Inne mechanizmy wirulencji bakterii z rodzaju *Serratia* sp. ... 40
8. Miejsca występowania i źródła izolacji pałeczek *Serratia* sp. ... 41
9. Metody izolacji i identyfikacji pałeczek z rodzaju *Serratia* ... 44
10. Cele pracy doktorskiej ... 48
11. Materiały ... 49
11.1. Materiał badań ... 49
11.2. Podłoża, odczynniki, sprzęt ... 51
12. Metody ... 55
12.1. Izolacja materiału mikrobiologicznego ... 55
12.2. Proteomiczna identyfikacja materiału mikrobiologicznego ... 56
12.3. Detekcja enzymu deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy ... 58
12.4. Detekcja enzymu hemolizyny [99] ... 60
12.5. Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji ... 60
12.6. Analiza długości O-swoistego łańcucha LPS ... 63
12.7. Analiza poziomu wrażliwości bakterii na działanie ludzkiej surowicy 68
13. Wyniki ... 70
13.1. Izolacja materiału mikrobiologicznego ... 70
13.2. Wyniki identyfikacji bakterii Gram-ujemnych ... 71
13.3. Wyniki detekcji enzymów zewnątrzkomórkowych u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* ... 88

13.4. Wyniki detekcji enzymu hemolizyny u *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 91
13.5. Wyniki detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 94
13.6. Charakterystyka długości O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 100
13.7. Wyniki analizy wrażliwości *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakterio-bójcze działanie surowicy 104
14. Podsumowanie pracy 120
15. Wnioski 125
16. Dyskusja 127
17. Streszczenie 139
18. Abstract 140
19. Bibliografia 141

Wykaz skrótów

ABC - pompy efflux typu ABC (*ang. ABC-type efflux pumps*)
ACC - acetylotrasferaza (*ang. acetyltransferase*)
AHL - lakton acylo-L-homoseryny AHL (*ang. Acyl-L-homoserine lactone-AHL*)
AKN - amikacyna (*ang. amikacin*)
AMC - amoksycylina z kwasem klawulanowym (*ang. amoxicillin with clavulanic acid*)
AmdB - pompa wielolekooporności SmdB (*ang. multidrug efflux pump SmdB*)
ampC - β-laktamaza klasy C (*ang. class C β-lactamase*)
AMX - amoksycylina (*ang. amoxicillin*)
ANT - O-nukleotydylotranferaza (*ang. O-nucleotidyltransferase*)
AP - nadsiarczan amonu (*ang. ammonium persulfate*)
APH - O-fosfotransferaza (*ang. O-phosphotransferase*)
APS - roztwór nadsiarczanu amonu (*ang. ammonium persulfate solution*)
ArmA - gen kodujący metylazę warunkującą oporność na amikoglikozydy (*ang. aminoglycoside resistance methylase gene*)
ATM - aztreonam (*ang. aztreonam*)
AZM - azytromycyna (*ang. azithromycin*)
BES-1 - β-laktamaza BES-1 (*ang. β-lactamase BES-1*)
BLAST - narzędzie lokalnego przyrównywania sekwencji (*ang. Basic Local Alignment Search Tool*)
CAZ - ceftazydym (*ang. ceftazidime*)
CDC - Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (*ang. Centers for Disease Control and Prevention*)
CEC - cefaklor (*ang. cefaclor*)
CFM - cefiksym (*ang. cefixime*)
CIN - podłoże Cefsulodyn-Irgasan-Nowobiocyna (*ang. Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar*)
CIP - ciprofloksacyna (*ang. ciprofloxacin*)
CLR - klarytromycyna (*ang. clarithromycin*)
CMN - klindamycyna (*ang. clindamycin*)
CPD - cefpodoksym (*ang. cefpodoxime*)
CPZ - cefoperazon (*ang. cefoperazone*)
CRO - ceftriakson (*ang. ceftriaxone*)
CSH - hydrofobowe powierzchnie komórki bakteryjnej (*ang. Cell Surface Hydrophobicity*)
CT - podłoże kaprylowo-talowe (*ang. caprylate-thallous agar*)
CTB - ceftybuten (*ang. ceftibuten*)
CTX - cefotaksym (*ang. cefotaxime*)
CTX-M - β-laktamaza CTX-M (*ang. β-lactamase CTX-M*)
CXM - cefuroksym (*ang. cefuroxime*)
CZN - fenazolina (*ang. cefazolin*)
DMSO - dimetylosulfotlenek (*ang. dimethyl sulfoxide*)
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)
dNTPs - mieszanina deoksyrybonukleotydów (*ang. deoxynucleotide triphosphates*)
DOX - doksycyklina (*ang. doxycycline*)
DTC - podłoże deoksyrybonukleaza z błękitem toluidynowym i cefalotyną (*ang. deoxyribonuclease-toluidine blue-cephalothin (DTC) agar*)

EDTA - kwas wersenowy (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid*)
ERY - erytromycyna (*ang. erythomycin*)
ESBL - β-laktamaza o rozszerzonym spektrum (*ang. extended-spectrum β-lactamases*)
FAD - kwas fusydowy (*ang. fusidic acid*)
FEP - cefepim (*ang. cefepime*)
FimH - adhezyna D-mannozo specyficzna fimbrii typu I (*ang. Type 1 fimbrin D-mannose specific adhesin*)
FlhC - regulator transkrypcji fimbrii FlhC (*ang. flagellar transcriptional regulator FlhC*)
FlhD - regulator transkrypcji fimbrii FlhD (a*ng. flagellar transcriptional regulator FlhD*)
FOX - cefoksytyna (*ang. cefoxitin*)
GES-1 - β-laktamaza GES-1 (*ang. β-lactamase GES-1*)
GME - gentamycyna (*ang. gentamicin*)
gnrA1 - gen oporności na chinolony gnrA1 (*ang. quinolone resistance gene gnrA1*)
gnrB1 - gen oporności na chinolony gnrB1 (*ang. quinolone resistance gene gnrB1*)
gnrB4 - gen oporności na chinolony gnrB4 (*ang. quinolone resistance gene gnrB4*)
gyrA - podjednostka A gyrazy DNA (*ang. DNA gyrase subunit A*)
HA - składniki hemaglutyniny (*ang. hemagglutinin components*)
HasA - białko A systemu pozyskiwania żelaza (*ang. heme acquisition system protein A*)
HasR - receptor błony zewnętrznej pobierania hemu (*ang. heme uptake outer membrane receptor*)
HCCA - kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy (*ang. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid*)
HemR - receptor heminy (*ang. hemin receptor*)
HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. high-performance liquid chromatography*)
IgA - immunoglobulina A (*ang. immunoglobulin A*)
IgG - immunoglobulina G (*ang. immunoglobulin G*)
IgM - immunoglobulina M (*ang. immunoglobulin M*)
IL-1 - interleukina 1 (*ang. interleukin 1*)
IL-6 - interleukina 6 (*ang. interleukin 6*)
IL-8 - interleukina 8 (*ang. interleukin 8*)
IMP-1 - metalo-β-laktamaza typu 2 (ang. metallo-β-lactamase type 2)
IPM - imipenem (ang. imipenem)
ITC - bulion z irgasanem, tikarcyliną i chloranem (*ang. irgasan- tikarcylina-chlorate broth*)
IITD PAN - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ITS - surowica inaktywowana termicznie (*ang. Heat Inactivated Serum*)
Kdo - kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy (*ang. 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid*)
KKCz - Koncentrat Krwinek Czerwonych (*ang. Red Cell Concentrate*)
KMN - kanamycyna (*ang. kanamycin*)
KPC-2 - β-laktamaza hydrolizująca karbapenemy KPC-2 (*ang. carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC 2*)
KPC-3 - β-laktamaza hydrolizująca karbapenemy KPC-3 (*ang. carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC 3*)

LC-MS - chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (*ang. liquid chromatography-mass spectrometry*)
LCN - linkomycyna (*ang. lincomycin*)
LOS - lipooligosacharyd (*ang. lipooligosaccharides*)
LPS - lipopolisacharyd (*ang. lipopolysaccharides*)
LPSN - baza taksonomii mikroorganizmów (*ang. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*)
LuxI - syntaza acylowanych laktonów homoseryny (*ang. acyl-homoserine-lactone synthase*)
LuxR - aktywator transkrypcji białka LuxR (*ang. transcriptional activator protein LuxR*)
MAC - kompleks atakujący błonę (*ang. Membrane Attack Complex*)
MALDI TOF- laserowa jonizacja wspomagana matrycą z detektorem czasu przelotu jonów (*ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*)
MBL - lektyna wiążąca mannozę (*ang. Mannose-Binding Lectin*)
MBP - białko wiążące mannozę (*ang. Mannose-Binding Protein*)
MEM - meropenem (*ang. meropenem*)
MNO - minocyklina (*ang. minocycline*)
MS - mannozo-wrażliwe (*ang. mannose-sensitive*)
MZN - mezlocylina (*ang. mezlocillin*)
NEO - neomycyna (*ang. neomycin*)
NET - netilmycyna (*ang. netilmicin*)
NHS - normalna surowica ludzka (*ang. Normal Human Serum*)
NXN - norfloksacyna (*ang. norfloxacin*)
OFX - ofloksacyna (*ang. ofloxacin*)
OIOM - Oddział Intensywnej Opieki Medycznej
OMP - białko błony zewnętrznej (*ang. outer membrane protein*)
Omp1 - poryna błony zewnętrznej Omp1 (*ang. outer membrane porin Omp1*)
OXA - oksacylina (*ang. oxacillin*)
POCH - Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice
PAF - czynnik aktywujący płytki (*ang. platelet-activating factor*)
PCM - Polska Kolekcja Mikroorganizmów (*ang. Polish Collection of Microorganisms*)
PCR - Łańcuchowa Reakcja Polimerazy (*ang. Polymerase Chain Reaction*)
PE - fosfatydyloetanoloamina (*ang. phosphatidylethanolamine*)
PEF - pefloksacyna (*ang. pefloxacin*)
PhlA - zewnątrzkomórkowa fosfolipaza A1 (*ang. extracellular phospholipase A1*)
PhlB - białko związane z fosfolipazą (*ang. phospholipase associated protein*)
PIM - kwas pipemidynowy (*ang. pipemidic acid*)
PIP - piperacylina (*ang. piperacillin*)
PLA - zewnątrzkomórkowa lipaza Pla (*ang. extracellular lipase Pla*)
QS - wyczuwalność liczebności bakterii (*ang. Quorum sensing*)
RcsB - białko regulujące trankrypcję RcsB (*ang. transcriptional regulatory protein RcsB*)
RIF - rifampicyna (*ang. rifampicin*)
R-LPS - szorstki LPS (*ang. rough LPS*)
RmtA - 16S rRNA (guanino1405)-N(7))-metylotransferaza (*ang. 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase*)
RmtB - 16S rRNA (guanino1405)-N(7))-metylotransferaza (*ang. 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase*)

RmtC - 16S rRNA (guanino1405)-N(7))-metylotransferaza (*ang. 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase*)
RNA - kwas rybonukleinowy (*ang. ribonucleic acid*)
RND - rodzina pomp efflux RND (*ang. Resistance-Nodulation- Division*)
RPM - obroty na minutę (*ang. revolutions per minute*)
rRNA - rybosomalne RNA (*ang. ribosomal rRNA*)
RssA - białko sensoryczne RssA regulacji ruchu rozpełzłego (*ang. swarming motility regulation sensor protein RssA*)
RssB - białko RssB regulacji ruchu rozpełzłego (ang. swarming motility regulation protein RssB)
SAM - ampicylina/sulbaktam (*ang. ampicillin/sulbactam*)
SdeA - fuzycjne białko błonowe (*ang. membrane fusion protein SdeA*)
SdeB - błonowy transporter pompy efflux (*ang. efflux pump membrane transporter*)
SdeC - białko Multidrug resistance protein MdtA
SdeD - Resistance-nodulation-cell division family efflux pump protein SdeD
SdeE - białko wielolekooporności MdtC (*ang. multidrug resistance protein MdtC*)
SdeX - pompa wielolekooporności SdeX (*ang. multidrug efflux pump SdeX*)
SdeY - transporter błonowy pompy efflux SdeY (*ang. efflux pump membrane transporter SdeY*)
SDS - dodecylosiarczan sodu (*ang. dodecylsulfate-Na-salt*)
SDS-PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (*ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
Sec - główny szlak sekrecyjny (*ang. general secretion pathway*)
ShlA - hemolizyna ShlA (*ang. hemolysin ShlA*)
ShlB - białko ShlB transportujące hemolizynę (*ang. hemolysin transporter protein ShlB*)
SHV - β-laktamaza SHV (*ang. β-lactamase SHV*)
SlpB - serralizyna SlpB (*ang. serralysin SlpB*)
SlpC - serralizyna SlpC (*ang. serralysin SlpC*)
SlpD - serralizyna SlpD (*ang. serralysin SlpD*)
S-LPS - gładki LPS (*ang. smooth LPS*)
SmaI - syntaza SmaI laktonu acylo-L-homoseryny AHL (*ang. acyl-homoserine-lactone synthase SmaI*)
SmaR - regulator SmaR transkrypcji quorum-sensing (*ang. quorum-sensing transcriptional regulator SmaR*)
SmdA - pompa wielolekooporności SmdA (*ang. multidrug efflux pump SmdA*)
SME-1 - β-laktamaza Sme-1 hydrolizująca karbapenemy (*ang. carbapenem-hydrolyzing β-lactamase Sme-1*)
SME-2 - β-laktamaza Sme-2 hydrolizująca karbapenemy (*ang. carbapenem-hydrolyzing β-lactamase Sme-2*)
SME-3 - β-laktamaza Sme-3 hydrolizująca karbapenemy (*ang. carbapenem-hydrolyzing β-lactamase Sme-3*)
SMN - streptomycyna (*ang. streptomycin*)
SpnI - syntaza SpnI laktonu acylo-L-homoseryny (*ang. acyl-homoserine-lactone synthase SpnI*)
SpnR - regulator SpnR transkrypcji zależnej od AHL (*ang. AHL-dependent transcriptional regulator SpnR*)
SPT - spektynomycyna (*ang. spectinomycin*)
SPX - sparfloksacyna (*ang. sparfloxacin*)
SR-LPS - półszorstki LPS (*ang. semi-rough LPS*)

SwrI - syntaza SwrI laktonu acylo-L-homoseryny (*ang. acyl-homoserine-lactone synthase SwrI*)
SwrR - białko SwrR (*ang. SwrR protein*)
SXT - trimetoprim/sulfametoksazol (*ang. trimethoprim/sulfamethoxazole*)
Tab - tabela
TEC - teikoplanina (*ang. teicoplanin*)
TEM - β-latamaza TEM (*ang. β-lactamase TEM*)
TEMED - N,N,N′,N′-Tetrametyloetylenodiamina (*ang. N,N,N′,N′-Tetramethyl ethylenediamine*)
TET - tetracyklina (*ang. tetracycline*)
TIC - tikarcylina (*ang. ticarcillin*)
TNF-α - czynnik martwicy nowotworów (*ang. tumor necrosis factor α*)
TOB - tobramycyna (*ang. tobramycin*)
TRIS - Tris(hydroksymetylo)aminometan (*ang. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane*)
TZP - piperacylina/tazobaktam (*ang. piperacillin/tazobactam*)
UPWr - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
VAN - wankomycyna (*ang. vancomycin*)
VIM - podklasa B1 metolo-β-laktamazy VIM-1 (ang. subclass B1 metallo-β-lactamase VIM-1)
YplA - fosfolipaza A (*ang. phospholipase A*

Wykaz tabel

Tabela 1. Chorobotwórczość *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w Polsce i na świecie 21
Tabela 2. Antybiotykooporność pałeczek *S. marcescens* 29
Tabela 3. Antybiotykooporność pałeczek *S. liquefaciens* 30
Tabela 4. Wykaz liczby przebadanych tusz zwierząt wolno żyjących i zwierząt hodowlanych 50
Tabela 5. Wykaz podłóż wykorzystywanych w realizacji zadań badawczych 51
Tabela 6. Wykaz sprzętu używanego do realizacji zadań badawczych 52
Tabela 7. Wykaz odczynników używanych do realizacji zadań badawczych 53
Tabela 8. Metodologia badań występowania enzymów zewnątrzkomórkowych 59
Tabela 9. Sekwencje zaprojektowanych starterów do badania obecności wybranych genów wirulencji 61
Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej [101] 62
Tabela 11. Warunki reakcji PCR [101] 62
Tabela 12. Zestawienie wyników izolacji bakterii Gram-ujemnych z tusz badanych zwierząt wolno żyjących i rzeźnych.....71
Tabela 13. Zestawienie wyników identyfikacji pozyskanych bakterii Gram-ujemnych od badanych zwierząt 72
Tabela 14. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich 74
Tabela 15. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich 75
Tabela 16. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej krów domowych 78
Tabela 17. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z odbytnicy krów domowych 80
Tabela 18. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej świń domowych.....83
Tabela 19. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z odbytnicy świń domowych.....85
Tabela 20. Zestawienie pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* badanych w kierunku obecności enzymów zewnątrzkomórkowych.....88
Tabela 21. Wyniki detekcji enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy dla *S. liquefaciens* oraz *S. marcescens* 90
Tabela 22. Częstość występowania hemolizyny u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 92
Tabela 23. Zestawienie izolatów *S. liquef*aciens i *S. marcescens* badanych w kierunku występowania wybranych genów wirulencji 94
Tabela 24. Wyniki detekcji wybranych genów wirulencji izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 96
Tabela 25. Profile genów wirulencji izolatów *S. liquefaciens* 98
Tabela 26. Profile genów wirulencji izolatów *S. marcescens*.....99
Tabela 27. Zestawienie puli izolatów *S. liquefaciens* charakteryzowanych pod kątem długości O-swoistego łańcucha LPS 101
Tabela 28. Zestawienie puli izolatów *S. marcescens* charakteryzowanych ze względu na długość O-swoistego łańcucha LPS.....101
Tabela 29. Zestawienie izolatów *S. liquef*aciens i *S. marcescens* wybranych do badania przeżywalności w 50% aktywnej NHS.....105

Tabela 30. Wyniki przeżywalności badanych szczepów kontrolnych PCM oraz izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w aktywnej 50% NHS (Sigma-Aldrich) 108
Tabela 31. Wyniki przeżywalności szczepów kontrolnych PCM oraz izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w inaktywowanej 50% NHS (Sigma-Aldrich) 109
Tabela 32. Przeżywalność badanych szczepów w aktywnej oraz w nieaktywnej 50% NHS (Sigma-Aldrich)..... 110
Tabela 33. Charakterystyka wybranych szczepów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* 122

Wykaz rycin

Rycina 1. Czynniki wirulencji u pałeczek *Serratia* sp. 32
Rycina 2. Wzrost pałeczek *Serratia* sp. na podłożu selektywnym CT [91].....45
Rycina 3. Schemat izolacji materiału mikrobiologicznego pochodzącego z wymazów.....56
Rycina 4. Ekstrakcja mieszaniny białek z użyciem kwasu mrówkowego i acetonitrylu [92]. 57
Rycina 5. Indykatory stosowane w podłożu DNAse LAB AGAR [96,97].....58
Rycina 6. Podłoża różnicujące używane do sprawdzania obecności żelatynazy [98], lipazy i deoksyrybonukleazy.....59
Rycina 7. Procedura izolacji LPS z proteinazą K [102].....64
Rycina 8. Procedura barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem srebra [104,105] 68
Rycina 9. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich i dzików euroazjatyckich 76
Rycina 10. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych 81
Rycina 11. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy świń domowych.....86
Rycina 12. Wyniki badania obecności enzymu lipazy i deoksyrybonukleazy dla wybranych izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens* 89
Rycina 13. Wyniki występowania hemolizyny u izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens* 93
Rycina 14. Przykładowy obraz detekcji genów *phlB* i *fimA* u *S. liquefaciens*.....97
Rycina 15. Przykładowy obraz detekcji genów *shlA* i *fimA* u *S. marcescens*.....97
Rycina 16. Obraz elektroforezy SDS-PAGE długości O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. marcescens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich oraz krów i świń domowych 102
Rycina 17. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* wyizolowanych od dzików euroazjatyckich 102
Rycina 18. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* wyizolowanych od krów domowych 103
Rycina 19. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych od saren europejskich i świń domowych 103
Rycina 20. Przykładowy wynik eksperymentu analizy wzrostu bakterii przy 50% NHS dla szczepu opornego (kg6.2c) i wrażliwego (41śg.2d) *S. marcescens* 106
Rycina 21. Przeżywalność badanych szczepów w aktywnej 50% NHS.....112
Rycina 22. Przeżywalność badanych szczepów w inaktywowanej 50% NHS 115
Rycina 23. Przeżywalność badanych izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens* w aktywnej 50% NHS 119

1. Pałeczki z rodzaju *Serratia*

Historia odkrycia pałeczek z rodzaju *Serratia* rozpoczyna się w 1819 roku. To właśnie wtedy włoski inżynier - Serrafino Serrati (18-sty wiek) odkrył przyczynę zabarwiania się żywności na kolor czerwony i powiązał to zjawisko z obecnością określonych bakterii. Przez wiele lat rodzaj *Serratia* zawierał tylko jeden gatunek, którym był *S. marcescens*. Takie informacje były aktualne aż do roku 1975. Badania biochemiczne prowadzone przez zespół Grimont'a w latach 80-tych XX wieku wprowadziły do tego rodzaju kolejne trzy gatunki, którymi były *S. plymuthica, S. liquefaciens* i *S. marinorubia*. Następnie prowadzone badania genetyczne wzbogacały rodzaj *Serratia* o kolejne gatunki [6].

Obecnie bakterie z rodzaju *Serratia* klasyfikowane są do typu *Enterobacterales* oraz rodziny *Yersiniaceae*. Według klasyfikacji LPSN (*ang. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) udostępnionej przez Jean P. Euzéby, do rodzaju *Serratia* zalicza się 31 gatunków. Tymi gatunkami są: *S. aquatlis, S. bockelmannii, S. bozhouensis, S. corallina, S. cutirubra, S. entomophila, S. ficaria, S. fonticola, S. glossinae, S. grimesii, S. inhibens, S. liquefaciens, S. marcescens, S. marinorubra, S. microhaemolytica, S. multitudinisentens, S. myotis, S. nematodiphila, S. nevei, S. odorifera, S. oryzae, S. plymuthica, S. proteamaculans, S. rhizosphaerae, S. rhodnii, S. rubidaea, S. sulfactantfaciens, S. symbiotica, S. ureilytica, S. intransitivum* i *S. vespertilionis*. Dla dwóch gatunków z rodzaju *Serratia* zostały również wyszczególnione podgatunki. W obrębie gatunku *S. marcescens* wyróżniamy podgatunek *marcescens* i *sakuensis*, natomiast w obrębie gatunku *S. proteamaculans* wyróżnia się podgatunek *proteamaculans* i *quinovora* [7].

Rodzaj *Serratia* to Gram-ujemne pałeczki o zaokrąglonych końcach. Wymiary komórek wynoszą od 0,5 do 0,8 μm szerokości i od 0,9 do 2 μm długości. Są to fakultatywne beztlenowce ze zdolnością poruszania się dzięki perytrychalnie umiejscowionym rzęskom [8]. Na przykładzie *S. marcescens* udowodniono, że pałeczki *Serratia* w reakcji na otoczenie potrafią zmieniać kształt swojej komórki oraz sposób poruszania się. W podłożu płynnym *Serratia* posiadają komórki pływające o krótkim, pałeczkowatych kształcie z jedną lub dwiema rzęskami. W podłożu półpłynnym komórki przekształcają się w tzw. „swarmer cells" o wydłużonym kształcie z rzęskami po bokach komórki. Natomiast w podłożu stałym komórki przybierają kształt krótkich pałeczek z rzęskami umieszczonymi perytrychalnie [8].

Bakterie te posiadają szeroką tolerancję na temperaturę inkubacji, która mieści się w przedziale od 10 do 36°C [6]. Jednakże pomimo tego udowodniono, że *S. liquefaciens, S. plymuthica, S. ficaria* i *S. odorifera* mają zdolność wzrostu w temperaturze około 4-5°C, natomiast *S. marcescens, S. rubidaea* i niektóre szczepy *S. odorifera* mogą rosnąć także w temperaturze 40°C. Pałeczki *Serratia* sp. są zdolne do wzrostu przy wartości pH 5-9 [8].

Rodzaj *Serratia* charakteryzuje produkcja czerwonego barwnika. Za barwę tą odpowiedzialna jest powszechnie znana prodigiozyna oraz mniej znana pirazyna. Prodigiozyna jest barwnikiem niedyfundującym do podłoża, natomiast pirazyna jest barwnikiem rozpuszczalnym w wodzie i wytwarzanym przez *S. marcescens* biotyp A4. W obrębie całego rodzaju, tylko trzy gatunki są w stanie produkować czerwony barwnik. Tymi gatunkami są *S. marcescens, S. plymuthica* oraz *S. rubidea* [8]. Bardzo ważnym czynnikiem warunkującym produkcję prodigiozyny jest temperatura inkubacji. Obserwowana jest intensywniejsza produkcja prodigiozyny w temperaturze 30°C w porównaniu do temperatury 37°C. Źródło węgla to kolejny czynnik, który istotnie wpływa na produkcję barwnika. Prodigiozyna jest również syntetyzowana w zależności od wzrostu zagęszczenia komórek w środowisku [6].

Poszczególne gatunki w obrębie rodzaju *Serratia* różnią pod względem cech biochemicznych. *S. ficaria, S. odorifera* i *S. rubidaea* charakteryzuje „ziemniaczany zapach" kolonii. Natomiast zdolność do wytwarzania indolu ma wyłącznie *S. odorifera*. Gatunki *S. marcescens, S. fonticola, S. grimesi, S. liquefaciens, S. odorifera* i *S. proteamaculans* posiadają zdolność do rozkładu lizyny i ornityny. Większość gatunków jako źródło węgla wykorzystuje L-arabinozę, D-rafinozę, D-sorbitol i D-ksylozę [6]. Gatunek *S. fonticola* pod względem cech biochemicznych zdecydowanie odbiega od pozostałych gatunków. W odróżnieniu od pozostałych gatunków nie wykorzystuje ona jako jedynego źródła węgla m. in. kaprynianu, maślanu amonu, kaprylanu czy też tyrozyny. W zamian za to jako źródło węgla wykorzystuje D-dulcytol, tagatozę i propionian fenylu. Kolejnymi cechami biochemicznymi odróżniającymi ten gatunek od pozostałych jest ujemny wynik w teście Voges-Proskauer'a oraz brak zdolności produkcji enzymu żelatynazy, lipazy i deoksyrybonukleazy [6].

2. Chorobotwórczość pałeczek *Serratia* sp. wobec ludzi

Pałeczki z rodzaju *Serratia* były uważane niegdyś za niegroźne, saprofityczne bakterie. Z czasem zaczęto odnotowywać pierwsze przypadki infekcji u ludzi wywołane przez te bakterie. *Serratia* sp. zaliczane są do grupy oportunistycznych patogenów człowieka, co oznacza, że wywoływane przez nie infekcje dotyczą osób z obniżoną odpornością, poddawanych antybiotykoterapii oraz małych dzieci, u których układ odpornościowy nie jest w pełni rozwinięty.

W ostatnich latach obserwowany jest znaczący wzrost przypadków zakażeń szpitalnych wywołanych przez pałeczki *Serratia* sp. Przeważnie infekcje tymi pałeczkami stwarzają poważne problemy na oddziałach neonatologii, kardiochirurgii, urologii oraz pediatrii [9].

Występowanie *Serratia* sp. w placówkach szpitalnych ma kilka udowodnionych źródeł. Dochodzenia epidemiologiczne podejmowane w przypadkach wystąpienia zakażeń szpitalnych wywołanych przez *Serratia* sp. pokazały, że ich przyczyną jest brak stosowania prawidłowej higieny i dezynfekcji rąk personelu medycznego, stosowania skażonych środków antyseptycznych, bądź też skażonych

farmaceutyków podawanych drogą dożylną oraz koncentratów czerwonych krwinek (KKCz).

S. liquefaciens jest określana rzadkim patogenem człowieka. Może być izolowana z różnych próbek klinicznych i powodować infekcje o nietypowym przebiegu. Schorzeniami wywoływanymi przez te bakterie są ropne stany zapalne narządów wewnętrznych, zapalenie wsierdzia, zapalenia stawów, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, infekcje dróg moczowych oraz bakteriemie. W środowisku klinicznym może być izolowana ze sprzętu medycznego, środków dezynfekujących oraz różnych preparatów związanych z transfuzją krwi. W 2018 roku w Turcji został opisany przypadek zapalenia otrzewnej wywołanej przez *S. liquefaciens* u pacjenta po dializie [10].

S. marcescens jest znana z wywoływania ognisk zakażeń szpitalnych, które wiążą się z wysokimi wskaźnikami zachorowalności i śmiertelności. Może się ona łatwo rozprzestrzeniać w środowisku szpitalnym i kolonizować sprzęt medyczny, płyny i roztwory medyczne oraz dozowniki ze środkami sanitarnymi. Przyczynami zakażeń szpitalnych może również nieprzestrzeganie zasad higieny przez personel medyczny.

Na oddziale chirurgii sercowo-naczyniowej w Hiszpanii w 1987 roku [6] stwierdzono występowanie epidemii *S. marcescens*. Bakteria ta wywoływała u zakażonych pacjentów infekcje ran pooperacyjnych, zapalenie otrzewnej oraz bakteriemie. Podjęte działania dotyczące źródła infekcji wykazały, że przyczyną pojawienia się schorzeń były ostrza do golenia owłosienia pacjentów przed operacjami, w złym stanie higienicznym [9].

Inne przykłady zakażeń szpitalnych dotyczą infekcji układu krążenia wywołanej przez *S. liquefaciens* w konsekwencji otrzymania skontaminowanych KKCz, bądź też przewlekłej infekcji układu moczowego u pacjentów. W 2001 roku w szpitalu w Stanach Zjednoczonych [11] opisano przypadki wystąpienia u pacjentów infekcji układu krążenia wraz ze wzrostem temperatury. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że przyczyną powstałej infekcji u pacjentów była skażona epoetyna alfa, która ze względu na oszczędność podawana była z wielodawkowych fiolek i bez dodatku konserwantów [11].

W Polsce infekcje szpitalne u ludzi wywołane przez *S. marcescens* opisano w 2004 roku [8]. Pomiędzy rokiem 1996 a 2000 stwierdzono obecność *S. marcescens* w ponad 500 próbach klinicznych w dwóch szpitalach w Gdańsku. *S. marcescens* izolowana była z różnych prób klinicznych: aspiratu tchawicy, plwociny, wymazu z gardła, wymazu z rany, moczu, krwi oraz płynów ustrojowych. Badane izolaty były oporne na piperacylinę, a średnio-oporne na m.in. piperacylinę z tazobaktamem, amikacynę, gentamycynę oraz ciproflacynę. *S. marcescens* izolowana była m.in. na oddziale internistycznym, chirurgicznym, urologicznym, neurologicznym, hematologicznym oraz pediatrycznym [12].

W Los Angeles oraz New Jersey w 2007 roku [13] opisano przypadek infekcji układu krążenia wywołanej przez *S. marcescens*. Prowadzone badania wykazały obecność pałeczek *S. marcescens* na różnych elementach wyposażenia szpitala, w tym w wielodawkowych fiolkach z lekami oraz w środkach sanitarnych.

Dochodzenie wykazało, że przyczyną infekcji układu krążenia pacjentów było zastosowanie skażonego przez *S. marcescens* roztworu siarczanu magnezu [13].

Zapalenie zastawki aortalnej wywołane przez *S. liquefaciens* opisano w 2007 roku na Tajwanie [14]. Pacjentem był 55-letni mężczyzna, który był obciążony chorobami towarzyszącymi jak m. in. zapaleniem trzustki. W żyle głównej mężczyzny rozwinęło się ropne zapalenie z ruchomą skrzepliną, która spowodowała wtórne ropne zapalenie wsierdzia. Skutkiem infekcji był zgon pacjenta. Przeprowadzone badania wykazały, że prawdopodobną przyczyną infekcji było użycie zanieczyszczonej wody do wstrzykiwania amfetaminy [14].

Choroby przyzębia są jednymi z najczęstszych chorób jamy ustnej, które są związane z tworzeniem biofilmu przez bakterie patogenne. Mikroflora przyzębia utrzymywana jest w odpowiednich proporcjach, a każde zaburzenie tej proporcji prowadzi do wywołania objawów chorobowych i rozprzestrzeniania się bakterii w całym organizmie. Bakterie pochodzące z biofilmu w konsekwencji mogą również wywoływać choroby innych narządów. Pomiędzy rokiem 2007 a rokiem 2014 prowadzono badania osób leczonych stomatologicznie w Rio de Janeiro [15]. Badane osoby zostały podzielone na 4 grupy: ze zdrową jamą ustną, z zapaleniem dziąseł, z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz z ostrym zapaleniem przyzębia. W każdej grupie badanych osób były izolowane zarówno pałeczki *S. liquefaciens* jak i *S. marcescens*. *S. liquefaciens* najczęściej była izolowana od pacjentów ze zdrową jamą ustną, a rzadziej od pacjentów z ostrym zapaleniem przyzębia. U osób z zapaleniem dziąseł i z przewlekłym zapaleniem przyzębia była izolowana z podobną częstością. *S. marcescens* najczęściej izolowana była od osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia, a od pacjentów ze zdrową jamą ustną i zapaleniem dziąseł była izolowana z podobną częstością. Najrzadziej pałeczka ta była izolowana od osób z ostrym zapaleniem przyzębia [15].

Zakażenia szpitalne wywołane przez *S. marcescens* zostały również opisane w Turcji w 2011 roku [16]. Pomiędzy marcem a majem 2006 roku zaobserwowano tam nagły wzrost przypadków infekcji powodowanych przez *S. marcescens* na OIOM-ie. W tym okresie u 9 noworodków stwierdzono czynną infekcję lub kolonizację tą bakterią. *S. marcescens* wywołała u dzieci infekcje układu moczowego, infekcje tkanek miękkich, zapalenie płuc oraz posocznicę ze skutkiem śmiertelnym. Bakterie izolowano z krwi, moczu, wymazu z ropnia nadgarstka oraz aspiratu tchawicy. Badania nie wykazały źródła pałeczek *S. marcescens*, ale wykluczono udział człowieka w wystąpieniu epidemii w szpitalu [16].

Kolejnym przykładem zdolności do wywoływania infekcji układu krążenia przez *S. marcescens* jest przypadek opisany w szpitalu na Tajwanie w 2013 roku [17]. W październiku odnotowano tam znaczący przyrost identyfikowanych *S. marcescens* z posiewów krwi. Izolaty były oporne na ampicylinę, cefazolinę oraz cefuroksym. Podjęte działania wyjaśniające pokazały, że wszyscy zakażeni pacjenci byli poddani operacji chirurgicznej, a źródłem *S. marcescens* był podawany pacjentom fentanyl [17].

S. marcescens jest również istotnym czynnikiem zagrażającym pacjentom z założonymi rożnego rodzaju wenflonami. Jak podaje literatura bardzo duże ryzyko

wystąpienia u pacjenta bakteriemii wiąże ze sobą założenie wenflonu. Jednakże zastosowanie odpowiedniego postępowania profilaktycznego skutecznie zmniejsza to zagrożenie. W Hiszpanii w 2016 roku [18] opisano przypadek wystąpienia epidemii *S. marcescens* u osób poddawanych hemodializie przez wenflony tunelowe. Przez okres roku obserwowano sukcesywny wzrost liczby przypadków pacjentów z objawami infekcji po zabiegu hemodializy. Badanie krwi potwierdziło infekcję wywołaną pałeczkami *S. marcescens*. U zainfekowanych pacjentów stwierdzono bezobjawową bakteriemię, bakteriemię bez wystąpienia gorączki u zdecydowanej większości osób oraz bakteriemię, której towarzyszyła podwyższona temperatura organizmu. Dochodzenie epidemiologiczne wykazało obecność *S. marcescens* w środku do dezynfekcji wenflonów tunelowych [18].

W 2016 roku w Afryce Zachodniej [19] udokumentowano wystąpienie infekcji powodowanej przez *S. liquefaciens* po transfuzji krwi. Pałeczka ta była izolowana od pacjentów z krwi, aspiratu płucnego, aspiratu nosowo-gardłowego i plwociny. W wyniku dochodzenia epidemiologicznego wykazano, że *S. liquefaciens* skolonizowała sól fizjologiczną, koncentrator tlenu oraz płyn do inhalacji w danej placówce medycznej [19].

W 2017 roku w szwajcarskim szpitalu [20] opisano kolejny przypadek wywołania infekcji u noworodków przez *S. marcescens*. Została ona wyizolowana u dzieci przebywających na OIOM-ie z wenflonu, wymazu oka oraz prób moczu. W celu wyjaśnienia źródła występowania pałeczek *S. marcescens* w szpitalu badano m.in. środki sanitarne, sprzęty komputerowe, środki pielęgnacyjne dla niemowląt, inkubatory oraz naczynia używanie do karmienia. Nie potwierdzono obecności *S. marcescens* na wyżej wymienionych powierzchniach, a za teoretyczną przyczynę wystąpienia infekcji podano nieprzestrzeganie prawidłowej higieny rąk personelu medycznego [20].

Pałeczki z rodzaju *Serratia* mogą również wywoływać infekcje oczu. Potwierdzeniem tego jest przypadek opisany w 2017 roku w Indiach [21]. Jest to pierwszy opisany przypadek infekcji klamry twardówkowej wywołanej przez *S. marcescens*. Pacjentem był 48-letni mężczyzna przyjęty do szpitala z objawami zaczerwienienia, bólu, łzawienia i wydzieliny wydostającej się z lewego oka. Podczas badania dostrzeżono mały element klamry o zabarwieniu czerwono-brązowym leżący na powierzchni rogówki. Z fragmentu klamry twardówkowej wyizolowano *S. marcescens*, która była wrażliwa na ciprofloksacynę [21].

W 2019 roku w Hiszpanii [22] przeprowadzono badania mające na celu scharakteryzowanie liczby wcześniaków przebywających na OIOM-ie skolonizowanych pałeczkami *S. marcescens*. Autorzy zwrócili szczególną uwagę na tę grupę pacjentów ze względu na niedojrzałość ich organów wewnętrznych oraz długą hospitalizację, co naraża je na wszelkie zagrożenia ze strony zakażeń szpitalnych. Badania wcześniaków są również szczególnie ważne ze względu na stan ich mikroflory jelitowej. Jak wskazują informacje zawarte w pracy, każde zmiany w składzie mikroflory dzieci mogą być przyczyną późniejszych zmian chorobowych, na przykład martwiczego zapalenia jelit lub sepsy. Grupę badaną stanowiło 26 noworodków urodzonych w szpitalu w Madrycie pomiędzy 2009 a 2010 rokiem.

Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że *S. marcescens* była izolowana w większości od wcześniaków urodzonych na drodze cesarskiego cięcia, poddanych antybiotykoterapii oraz przebywających w szpitalu przez dłuższy okres czasu. Ponadto na podstawie okresowych badań mikroflory jelit zaobserwowano, wzrost częstości izolacji *S. marcescens* wraz ze wzrostem tygodnia życia noworodków. Badania antybiotykooporności wyizolowanych pałeczek *S. marcescens* wykazały oporność bakterii na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefuroksym, cefoksytynę, trimetoprim z sulfametoksazolem oraz piperacylinę z tazobaktamem [22].

Wywoływanie infekcji szpitalnych przez *S. marcescens* zostało również opisane w Singapurze w 2019 roku [23]. Od sierpnia do września 2016 roku stwierdzono 11 przypadków infekcji noworodków wywołanych przez *S. marcescens*. U dzieci stwierdzono bakteriemie oraz zapalenie spojówek. Choroby te wyleczono za pomocą antybiotyków: ceftazydymu, gentamycyny i tobramycyny [23].

Infekcje operowanego miejsca stanowią najczęstsze przykłady infekcji szpitalnych. Najczęściej są one skutkiem komplikacji podczas operacji, mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie dla życia pacjenta oraz niosą ze sobą zwiększenie kosztów opieki zdrowotnej. W 2020 roku w Korei Południowej [24] opisano przypadek infekcji miejsca po zabiegu kraniotomi, czyli otwarcia czaszki, przez *S. marcescens*. Lokalna epidemia wywołana przez tą bakterię dotyczyła 5 pacjentów w różnym wieku (11-, 66- i 76-letniego mężczyzny oraz 14- i 29-letniej kobiety). Izolaty *S. marcescens* wyizolowane od pacjentów oporne były na amoksycylinę z kwasem klawulanowym i nitrofurantoinę. Przeprowadzone dochodzenie epidemiologiczne wykazało, że źródłem infekcji ran operacyjnych były skolonizowane przez *S. marcescens* maszynki używane do golenia głowy przed zabiegiem [24].

W Hiszpanii w 2020 roku [25] opisano infekcje wywołane przez *S. marcescens* u 10 pacjentów po operacjach kardiochirurgicznych w czasie ich tygodniowego pobytu w szpitalu. Zakażeni pacjenci byli obciążeni chorobami towarzyszącymi takimi jak m.in. cukrzyca, przewlekłe choroby płuc oraz otyłość. Głównym objawem infekcji było ropne zakażenie rany oraz bakteriemia. Ropny wysięk rany charakteryzował się rzadką konsystencją oraz brązowym zabarwieniem. Podczas dochodzenia epidemiologicznego przebadano wszystkich pacjentów i wykazano ponad 50% skolonizowanych osób pałeczkami *S. marcescens*. Przedstawione przez autorów pracy dane wskazują, że źródłami infekcji *Serratia* sp. u pacjentów kardiochirurgicznych są maszynki do golenia, elektrody wielokrotnego użytku lub bielizna operacyjna. Wyniki przeprowadzonych badań ostatecznie wykazały, że źródłem infekcji *S. marcescens* był roztwór chlorheksydyny stosowany do dezynfekcji skóry przed i po zabiegu [25].

Gram-ujemne pałeczki, w tym pałeczki z rodzaju *Serratia*, są nieustannym problemem powodującym infekcje związane z używaniem wenflonów. Pałeczki *Serratia* sp. stają się nowo pojawiającymi się patogenami (*ang. emerging pathogens*) w zapaleniu otrzewnej oraz miejsca ujścia wenflonów. W Hong Kongu w 2021 roku [26] opublikowano badania grupy pacjentów z zapaleniem otrzewnej i miejsca ujścia

wenflonu. *Serratia* sp. wywołująca infekcje miejsca ujścia wenflonu izolowane były z ropnej wydzieliny, rumienia na skórze wokół wenflonu oraz ze skóry wokół wenflonu bez widocznych zmian chorobowych. Zapalenie otrzewnej wywołane przez *Serratia* sp. objawiało się gorączką i bólem brzucha oraz obecnością neutrofili i zmianami patologicznymi w obrębie jamy brzusznej [26].

Przykłady wywoływanych schorzeń przez pałeczki *S. liquefaciens* i *S. marcescens* opisane w tekście powyżej zostały również zestawione w Tab. 1.

Tabela 1. Chorobotwórczość *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w Polsce i na świecie

Gatunek bakterii	Jednostka chorobowa / Rodzaj infekcji	Miejsce wykrycia	Rok	Źródło
S. marcescens	Infekcja rany operacyjnej głowy	Korea Południowa	2020	[24]
S. liquefaciens ***S. marcescens***	Choroby przyzębia	Brazylia	2016	[15]
S. marcescens	Kolonizacja noworodków w szpitalu	Hiszpania	2019	[22]
S. marcescens	Infekcja układu krążenia	USA	2007	[13]
S. liquefaciens	Zapalenie otrzewnej	Turcja	2018	[10]
S. liquefaciens	Infekcje układu krążenia, ropne zapalenia skóry, zapalenie wsierdzia	Afryka	2016	[19]
S. liquefaciens	Zapalenie zastawki aortalnej	Tajwan	2007	[14]
S. marcescens	Infekcje ran pooperacyjnych, zapalenie otrzewnej, bakteriemia	Hiszpania	1987	[6]
***Serratia* sp.**	Zapalenia otrzewnej	Hong Kong	2021	[26]
S. marcescens	Sepsa, infekcje układu moczowego, infekcje tkanek miękkich, zapalenie płuc	Turcja	2011	[16]
S. marcescens	Bakteriemia, ropne zakażenie rany	Hiszpania	2020	[25]
S. marcescens	Infekcje oczu, infekcje układu moczowego	Szwajcaria	2017	[20]
S. marcescens	Infekcje płuc, moczu, krwi	Polska	2004	[8]
S. marcescens	Infekcje układu krążenia	Tajwan	2013	[17]
S. marcescens	Infekcja klamry twardówkowej	Indie	2017	[21]
S. marcescens	Bakteriemia	Hiszpania	2016	[84]
S. marcescens	Bakteriemia, zapalenie spojówek	Singapur	2019	[23]

W ciągu ostatnich czterech dekad występowanie *Serratia* sp. doprowadzało do powstania szybko rozprzestrzeniających się, długotrwałych ognisk zakażeń nabytych w czasie opieki medycznej. Często takie zakażenia występują u noworodków, prowadząc do wysokiej zachorowalności i śmiertelności. Według opublikowanych danych [27] po zbadaniu osób poniżej 19 roku życia stwierdzono, że najczęściej od dzieci izolowana była *S. marcescens*, ale występowały również izolacje *S. liquefaciens*, *S. odorifera* oraz *S. plymuthica* [27].

2.1. Nosicielstwo i chorobotwórczość pałeczek *Serratia* sp. wobec zwierząt

Chorobotwórczość rodzaju *Serratia* nie dotyczy jedynie wywoływania chorób u ludzi. Pałeczki te mogą być również chorobotwórcze względem różnych gatunków zwierząt. Istnieją również doniesienia o izolowaniu *S. marcescens* od zdrowych ptaków, co jest podstawą do wnioskowania, że niektóre gatunki ptaków mogą być zarówno nosicielami *Serratia,* jak i źródłem infekcji odzwierzęcych [29].

W literaturze spotykane są przypadki opisu schorzeń zwierząt będącymi następstwem infekcji pałeczkami *Serratia* sp. U zwierząt zakażonych pałeczkami *Serratia* sp. najczęściej obserwuje się posocznicę, zapalenie sutka, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie płuc i wsierdzia oraz zapalenie kości i szpiku kostnego, lub też zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [28]. Pałeczki *S. marcescens* i *S. liquefaciens* wywołują ogniska zapalenia wymienia u krów mlecznych generując tym straty w hodowli [30]. U krów *Serratia* sp. wywołują stany zapalne zarówno w okresie laktacji, jak i w okresie zasuszenia [31]. Niektóre doniesienia literatury pokazują, że pałeczki z rodzaju *Serratia* powodują zapalenie wsierdzia i posocznicę u koni, posocznicę i zapalenie szpiku kostnego u psów i kotów, ropnie wewnątrzczaszkowe i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u jeleni, czy też zapalenie płuc u lwów morskich [32]. *Serratia* sp. są również związane z infekcjami kręgowców zimnokrwistych - wywołują guzkowatą infekcję u jaszczurki kubańskiej (*Anotis equestris*), podskórny ropień u iguany, zapalenie stawów u jaszczurki *Tupinambis tequixin* oraz chorobę wrzodową u żółwia *Chrysemys picta* [33].

W 1988 roku w Anglii opisano przypadek pokazujący powiązanie pomiędzy infekcjami wywoływanymi przez *S. marcescens*, a poronieniem cieląt krów i bawołów. W okresie 2 do 3 dni po niespodziewanych poronieniach obserwowano czerwoną wydzielinę z dróg rodnych samic. Po przeprowadzeniu badań cieląt stwierdzono zmiany chorobowe o zabarwieniu od różowego do czerwono-brązowego występujące w płucach, wątrobie, śledzionie i w nerkach oraz nagromadzenie się płynu w jamie opłucnej. Dochodzenie epidemiologiczne wykazało, że źródłem infekcji było nasienie samca rozpłodowego, w którym znajdowały się pałeczki *S. marcescens* [34].

W stanie Utah, USA w 2015 roku zgłoszono przypadek ogólnej infekcji objawiającej się zapaleniem skóry i tkanki łącznej oraz zapaleniem mięśni wywołanym przez *S. marcescens* [35]. Przypadek ten dotyczył 18-miesięcznego kota, który trafił pod opiekę lekarzy weterynarii po utykaniu na jedną łapę utrzymującym się przez 5 dni. W trakcie badań u kota zdiagnozowano obrzęk spowodowany ropniem w rejonie od miednicy poprzez biodra aż do opuszków łap. Po trzech dniach od identyfikacji pierwszego ropnia zidentyfikowano drugie podobne ognisko zlokalizowane nad prawą grzbietowo-boczną częścią kości krzyżowej. W kolejnych dniach obserwowano powiększenie się obrzęku prawej kończyny. Ze względu na brak polepszenia się stanu zdrowia zwierzęcia pomimo zastosowanego leczenia podjęto decyzję o uśpieniu. W trakcie sekcji zwłok stwierdzono zmianę prawidłowej barwy i zmiany martwicze mięśnia dwugłowego uda. Dokładniejsze badania mikroskopowe zmian wykazały wrzodziejące i ropne

zapalenie skóry i martwiczo-ropne zapalenie tkanki łącznej i zapalenie mięśni, a z zainfekowanych tkanek wyizolowano *S. marcescens* [35].

Kolejny przypadek infekcji zwierzęcia wywołanej pałeczkami *S. marcescens* opisano w Szkocji w 2011 [36]. Aksolotl meksykański (*Ambystoma mexicanum*) zmarł po 12 godzinach od momentu wystąpienia pierwszych oznaków choroby. Podczas sekcji zwłok stwierdzono obecność mętnego, jasnoczewonego płynu w jamie ciała oraz obecność wieloogniskowych zmian w osierdziu, komorach mięśnia sercowego i w przedsionkach serca. Badania mikroskopowe zmienionych tkanek potwierdziły liczne zmiany chorobowe w sercu, wątronie i w żołądku, którym towarzyszyło obecność skupisk Gram-ujemnych pałeczek. Badanie mikrobiologiczne wykazało obecność *S. marcescens* w jamie ciała i w osierdziu. Opisany przypadek został zaklasyfikowany do występującego u płazów zespołu czerwonych nóg (anf. *red-leg syndrome*), który jest również określany mianem posocznicy dermatologicznej [36].

Naukowacy z Japonii i Korei opisali w 2017 roku przypadek nagłej śmierci pawia indyjskiego (*Pavo cristatus*) spowodowej infekcją *S. marcescens* [28]. U przebywajacej w zoo samicy pawia indyjskiego po dwóch dniach obserwowanej zmiany zachowania stwierdzono zapalenie spojówki w prawym oku. Pomimo stosowania terapii antybiotykowej, po dwóch dniach ptak zmarł. Przeprowadzona sekcja zwłok wykazała obecność grubej pseudobłony pod powieką oka, oraz zmian chorobowe w sercu widocznych jako żółtawe wodosierdzie i łagodne obrzękowe zmiany osierdzia. Badanie histopatologiczne ujawniło zmiany martwicze komórek wątroby i naciek zapalny w wątrobie i osierdziu. U ptaka stwierdzono łagodne śródmiąższowe zapalenie płuc. Badanie mikrobiologiczne prób pobranych ze zmienionego chorobowo oka i wątroby potwierdziło obecność pałeczek *S. marcescens* [28].

W Portugalii w 2016 roku zgłoszono przypadek infekcji dysków w kręgosłupie u bociana białego (*Ciconia ciconia*) wywołanej przez pałeczki *S. marcescens* [29]. Do szpitala weterynaryjnego w Portugalii przetransportowano dorosłego osobnika bociana białego w kilka godzin po wypadku samochodowym. W trakcie hospitalizacji u zwierzęcia wystąpiła biegunka o etiologii bakteryjnej. Wykonane prześwietlenie ujawniło zmiany destrukcyjne rejonów międzykręgowych w odcinku piersiowym kręgosłupa. Po stwierdzeniu ostrego zapalenia dysków kręgosłupa i braku poprawy w leczeniu, bociana uśpiono. W sekcji zwłok stwierdzono obecność zmian ziarniakowatych w przestrzeniach międzykręgowych odcinka piersiowego oraz martwicze zmiany tych miejsc z obszarami zapalenia ropnego. Pałeczki *S. marcescens* były obecne we wszystkich badanych tkankach i we krwi. Jednakże najwięcej tych pałeczek obserwowano w tkankach martwiczych [29].

W Polsce zostały odnotowane przypadki infekcji pałeczkami z rodzaju *Serratia* sp. u ryb słodkowodnych. W pracy opublikowanej w 2015 roku przedstawiono, że *S. liquefaciens* jest jednym z gatunków odgrywających największą rolę w chorobotwórczości u ryb. Najwięcej opisanych przypadków infekcji u ryb dotyczy ryb łososiowatych. Pierwsze przypadki infekcji u ryb wywołanych przez rodzaj *Serratia* zgłoszono w latach 90-tych ubiegłego wieku i dotyczyły w głównej mierze

gatunku *S. plymuthica*. Gatunek ten izolowano od łososi atlantyckich (*Salmo salar*), pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*) i troci wędrownej (*Salmo trutta*). Infekcja *S. plymuthica* u ryb objawiała się wypadaniem łusek, ogólnym osłabieniem, powiększeniem narządów wewnętrznych takich jak wątroba, nerka i śledziona. W kolejnych latach w Polsce zaczęły być izolowane inne gatunki z tego rodzaju i były nimi *S. liquefaciens, S. fonticola* i *S. proteamaculans*. Bakterie te najczęściej powodowały zmiany skórne objawiające się przekrwieniami lub wybroczynami. Obserwowano również wystąpienie stanu zapalnego jelit i obecność płynu surowiczego w jamie ciała. Śmiertelność ryb zainfekowanych tymi bakteriami sięgała 35%. *S. liquefaciens* była gatunkiem, który izolowany był od ryb wstępujących do pomorskich rzek podczas tarła, czyli u ryb takich jak łososie i trocie. Infekcja u ryb objawiała się podobnie do choroby wrzodziejącej martwicy skóry [37].

Infekcje u ryb wywołane przez *S. liquefaciens* opisano również w Turcji w 2001 roku [39]. Zainfekowanym gatunkiem był pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), u którego obserwowano zmiany w zachowaniu oraz wypadanie łusek. Do tych zmian dołączyły również zmiany chorobowe narządów wewnętrznych - obrzęk nerek, krwotoczne zmiany w skrzelach, krwawy wysięk w jelitach i zmiany w kolorze tkanek wątroby. W zmienionych chorobowo narządach wewnętrznych potwierdzono obecność Gram-ujemnych bakterii. *S. liquefaciens* jest uważana za bakterię patogenną dla ryb i powoduje u nich śmiertelną infekcję. Bakteria ta może powodować śnięcie ryb generując tym wysokie straty w hodowlach [39].

Zdolność wywoływania infekcji przez *S. marcescens* u zwierząt potwierdzono również w Brazylii w 2007 roku [38]. Po dostarczeniu do zoo, śmigacz (*Eupetomena macroura*) nie miał zdolności do lotu, a badanie lekarza weterynarii ujawniło umiarkowany zanik mięśni piersiowych ptaka. Po dwudniowej hospitalizacji stan zdrowia ptaka uległ pogorszeniu i zwierzę zmarło. Wyniki sekcji zwłok wykazały obecność płynu otrzewnowego w jamie ciała. W badanych próbach zawartości jelit i krwi zidentyfikowano pałeczki *S. marcescens* [38].

W 2008 roku przez naukowców ze Słowacji [40] został opisany przypadek martwiczego zapalenia powięzi wywołanego przez *S. marcescens* po usunięciu zęba u dobermana pinczera. Do weterynarza został przyjęty pies z objawami niewydolności serca i obrzękiem bocznej ściany brzucha, które wystąpiły dwa dni po usunięciu zęba. W wykonanej biopsji zmiany brzusznej zaobserwowano bardzo dużą liczbę wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych Gram-ujemnych pałeczek. Po zastosowanej antybiotykoterapii obserwowano poprawę stanu zdrowia psa, jednakże pomimo zastosowanego leczenia nie obserwowano oznak zaleczenia się rany po usunięciu zęba. W kolejnych dniach u psa zaobserwowano pojawienie się rany w okolicy pępkowej, z której pobrano wymaz i stwierdzono obecność w nim pałeczek *S. marcescens*. Niestety ze względu na rozmiar zmian chorobowych podjęto decyzję o uśpieniu psa. Sekcja zwłok wykazała poważne zmiany skórne i tkanki podskórnej. Prowadzone badania potwierdziły obecność pałeczek *S. marcescens* we wszystkich chorobowo zmienionych miejscach [40].

Kolejnym przykładem infekcji wywołanej przez pałeczki *Serratia* sp. u zwierząt jest wywołanie endogennego zapalenia gałki ocznej, czyli stanu

zapalnego obejmującego wszystkie struktury wewnątrzgałkowe, u kota. Przypadek opisano w 2019 roku we Francji. Endogenne zapalenie jest stosunkowo rzadziej opisywane w porównaniu do egzogennego zapalenia i dotyczy sytuacji gdy bakterie dostają się do narządu poprzez krew. W opisywanym przypadku zapalenia oka u kota, bakterie przekroczyły barierę krew-siatkówka wywołując tym zapalenie gałki ocznej. Podany przypadek dotyczył 8-letnego kota, który został przyjęty do weterynarza z początkowymi objawami ostrej niewydolności oddechowej. Po 4 dniach u kota ciągle obserwowano pogorszenie się stanu zdrowia. Dodatkowo rozpoznano również zapalenie błony naczyniowej lewego oka. Oko objawiało obrzęk rogówki, zaczerwienienie z dużym skrzepem oraz przekrwienie tęczówki i rogówki. Ciecz wodnista oka wskazywała na ropne zapalenie, co zostało potwierdzone poprzez izolację z cieczy pałeczek *S. marcescens*. W wyniku infekcji oka kot stracił wzrok [41].

W literaturze istnieją również doniesienia opisujące wywoływanie przez *Serratia* sp. zapalenia wymienia u krów mlecznych. Te informacje potwierdzają dane opublikowane przez naukowców z Finlandii w 2019 roku [30]. Opisują one dwa przypadki lokalnej epidemii wywołanej pałeczkami *S. marcescens* powodującej zapalenie wymion u krów. W pierwszej opisywanej farmie w okresie od 2011 roku do roku 2016 wyizolowano *S. marcescens* z 35 próbek mleka, co określało częstość izolacji tej bakterii na poziomie 39%. Z kolei w drugiej farmie w okresie od 2015-2017 roku częstość izolacji *S. marcescens* określono na poziomie 35%. W jednym i w drugim przypadku za źródło pałeczek *S. marcescens* opisywano mleko i środek do czyszczenia strzyków. Występowanie *Serratia* u krów stanowi potencjalną przyczynę rozprzestrzeniania się tych bakterii do środowiska. Dodatkowo zakażone krowy mogą przechodzić daną infekcję chronicznie, przez co stają się nosicielami tej bakterii. Czasami infekcje wywołane *S. marcescens* są trudne do wyleczenia i wiążą się z koniecznością uboju krów, co niesie ze sobą straty ekonomiczne [30]. Przypadek zapalenia wymienia u bydła opisano również w Iraku w 2017 roku. Częstość izolacji pałeczek *S. marcescens* z próbek mleka wynosiła 4% na 150 badanych prób. Z kolei zapalenie wymienia wywołane przez *S. marcescens* stwierdzono u 4/120 krów [42]. Badania nad bakteriami wywołującymi zapalenie wymienia u krów mlecznych prowadzono również w Polsce. Potwierdzają to dane opublikowane w 2006 roku. Stwierdzono wówczas dużą różnorodność bakterii odpowiedzialnych za tą chorobę, w tym gatunek *S. marcescens* [43].

Pierwszy przypadek izolacji *S. liquefaciens* z zakażenie układu moczowego u maciory opisano w 2019 roku w Grecji [44]. Występująca w pęcherzu moczowym *S. liquefaciens* wywołała obrzęk, przekrwienie i umiarkowany krwotok. W nabłonku pęcherza moczowego obserwowano również owrzodzenia. Przeprowadzone analizy badania krwi nie wykazały odstępstw od norm, z wyjątkiem stwierdzenia neutrofilii. Badanie moczu z kolei wykazało zmniejszony ciężar właściwy moczu, pH moczu o wartościach zasadowych, obecność w nim białek i bilirubiny. Dodatkowo stwierdzono nieprawidłowości w osadzie moczu, który zawierał liczne bakterie, nabłonki, białe krwinki oraz kryształy szczawianu wapnia [44].

Bakterie z rodzaju *Serratia* mają również zdolność do rozprzestrzeniania się w szpitalach weterynaryjnych. Taki przypadek został opisany w 1981 roku na przykładzie infekcji wywołanych u hospitalizowanych psów i kotów. Źródłem pałeczek *S. marcescens* był preparat stosowany do odkażania. Bakteria ta została wyizolowana z cewników, dróg oddechowych, skóry, układu moczo-płciowego, ran, kości i stawów, krwi oraz uszu, wątroby i płynu mózgowo-rdzeniowego [45].

2.2. Zwierzęta źródłem infekcji *Serratia* sp.

Infekcje wywoływane u ludzi przez mikroorganizmy bytujące u zwierząt określane są mianem zoonoz. Do głównych przedstawicieli bakterii powodujących choroby odzwierzęce należą *Salmonella, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica,* czy też *Staphylococcus aureus* [46]. Jednakże niedawno opublikowane prace naukowe [47,48,49,51] wskazują również na rodzaj *Serratia* jako potencjalnych kandydatów do grupy bakterii odpowiedzialnych za infekcje u ludzi.

Jednym z przypadków wystąpienia infekcji powodowanej przez *Serratia* sp. u ludzi, w następstwie kontaktu ze zwierzętami opisano w 2021 roku w Filadelfii, USA [47]. Dotyczył on wystąpienia ciężkiej infekcji skóry związanej z zadrapaniem przez kota 71-letnej kobiety, która dodatkowo miała wiele chorób towarzyszących. W trakcie badania u pacjentki stwierdzono rumień i bolesną tkliwość lewej i prawej nogi związane z ranami zadrapania na nogach. W związku z podejrzeniem sepsy jako następstwa stwierdzonego zapalenia płuc, pacjentkę poddano antybiotykoterapii. Po 24 godzinach doszło jednak do pogorszenia się stanu zdrowia. W dodatniej hodowli krwi stwierdzono obecność pałeczek Gram-ujemnych. Ze względu na wcześniejsze zgłoszenie o podrapaniu przez kota, pacjentkę leczono antybiotykami w kierunku *Vibrio, Bartonella* i *Pasteurella*. Po zastosowanej terapii nadal stan pacjentki nadal się pogarszał. Tomografia komputerowa lewej nogi wykazała ciężką infekcję tkanki łącznej, na której z czasem zaczęły pojawiać się pęcherze. Po dalszych analizach krwi stwierdzono obecność w niej pałeczek *S. marcescens,* na którą zastosowano antybiotyk ceftriakson. Zapalenie tkanki łącznej lewej nogi uległo jednak nasileniu. Istniejące pęcherze przekształciły się w owrzodzenia, a w dotąd niezmienionych chorobowo miejscach zaczęły pojawiać się pęcherze, którym towarzyszyły podskórne krwotoki. Podobne objawy powiły się z czasem na prawej nodze. Opisany przypadek jest pierwszym przypadkiem powiązania infekcji *S. marcescens* u człowieka z zadrapaniem przez kota [47].

Kolejny przypadek infekcji *Serratia* sp. jako zoonozy opisano w 2019 roku w USA. Pokazuje on przypadek 55-letniej kobiety leczonej onkologicznie, która została zadrapana przez psa. Ze względu na osłabioną odporność pacjentki zastosowano antybiotykoterapię wykorzystując amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Trzy dni później obraz rany pogorszył się. Wystąpił rumień wokół miejsca zadrapania, obrzęk i bolesna tkliwość wokół miejsca zadrapania. Poza tym kobieta zaczęła gorączkować. Po siedmiu dniach leczenia rumień zmniejszył się, jednakże pojawił się ból ręki i zmniejszona siła w zgięciu nadgarstka. Prawa ręka pacjentki wykazywała obrzęk tkanek miękkich, a kolejne badania potwierdziły wysięk

w stawie łokciowym i zapalenie mięśnie bez objawów ropnego zapalenia. Po dziesięciu dniach wokół rany pojawił się wysięk surowiczy, z którego wyizolowano *S. marcescens*. Po zastosowanej antybiotykoterapii wyleczenie nastąpiło w okresie dwóch miesięcy [48].

Przyczyną groźnej infekcji wywołanej przez pałeczki *S. marcescens* było także ukąszenie przez węża opisane w Indiach w 2022 roku. Przypadek dotyczył 3-letniego chłopca przyjętego do szpitala z bólem i obrzękiem lewej łydki po ukąszeniu przez węża. W niedługim czasie doszło do niewydolności oddechowej i dziecko zostało zaintubowane. Po podaniu surowicy przeciw jadowi węża stan chłopca poprawił się i został rozintubowany. W drugim dniu, od momentu poprawy zdrowia, u dziecka pojawiła się gorączka wraz z powiększającym się obszarem zmiany martwiczej na nodze. Zastosowanie antybiotykoterapii nie polepszyło stanu pacjenta, a na nodze obserwowano powiększający się obszar martwiczy z obrzękiem. Dziecko z podejrzeniem martwiczego zapalenia powięzi zostało skierowanie na terapię poprzez oczyszczanie rany. Po wielokrotnych procesach płukania rany i zastosowanej antybiotykoterapii opanowano infekcję i podjęto decyzję o przeszczepieniu skóry w 25 dniu od momentu rozpoczęcia infekcji. Badania mikrobiologiczne potwierdziły obecność *S. marcescens*. Jest to pierwszy zgłoszony przypadek martwiczego zapalenia powięzi wywołanego przez *S. marcescens* w następstwie ukąszenia przez węża [49].

Wśród zwierząt będących nosicielami *S. marcescens* są również iguany. Takie przypadki zostały zgłoszone w Teksasie w 2010 roku [50] oraz w Bostonie w 1999 roku [51]. Opisują one łącznie 3 przypadki różnych postaci zapalenia tkanki łącznej w następstwie ugryzienia przez iguanę. Pierwszy przypadek dotyczy 55-letnego mężczyzny, u którego po ugryzieniu przez iguanę wystąpił rumień z rozsianymi pęcherzami na łydce. U 25-letniego mężczyzny z kolei w miejscu ugryzienia pojawił się pęcherz, który w ciągu 48 godzin zmienił się w pęcherz krwotoczny. Z obu opisanych ran została wyizolowana *S. marcescens*, której infekcję wyleczono za pomocą trimetoprimu z sulfometoksazolem [50]. Przypadek 8-letniego chłopca z ranami szarpanymi po ugryzieniu przez iguanę opisano w Bostonie. Pokazuje on wystąpienie obrzęku z nasilającym się bólem, pojawienie się rumienia i ropnej wydzieliny oraz wystąpienie ograniczenia w ruchliwości palca z towarzyszącą gorączką. Obrzęk tkanek miękkich wywołany został przez *S. marcescens*. Zastosowana antybiotykoterapia pozwoliła na wyleczenie infekcji w okresie 5 dni [51].

3. Antybiotykooporność pałeczek *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens*

Pałeczki z rodzaju *Serratia* posiadają naturalną oporność na pewne grupy antybiotyków. Niestety coraz częściej donosi się o wzrastającej oporności na antybiotyki *S. marcescens*. Bakteria ta jest już określana jako wielolekooporna, co ma ogromne znaczenie w szczególności przy zakażeniach szpitalnych.

W 2003 grupa badaczy Niemiec opublikowała pracę [52] dotyczącą naturalnej oporności oraz wrażliwości na antybiotyki wybranych gatunków z rodzaju

Serratia skupiając się w szczególności na pałeczkach *S. marcescens* i *S. liquefaciens*. Praca ta prawdopodobnie jako jedyna przedstawia zestawienie oporności, wrażliwości i średniej wrażliwości/oporności na antybiotyki tych bakterii. Zawarte w publikacji informacje wskazują również, że *S. marcescens* jest bardziej oporna na antybiotyki w porównaniu do pałeczki *S. liquefaciens* [52].

Autorzy pracy wskazują [52], że pałeczki *S. marcescens* i *S. liquefaciens* są naturalnie wrażliwe na trimetoprim/sulfametoksazol z grupy antyfolianów, amiksycylinę, gentamycynę, streptomycynę, kanamycynę, neomycynę oraz spektynomycynę z grupy aminoglikozydów. W grupie penicylin *S. liquefaciens* i *S. marcescens* są wrażliwe na piperacylinę, połączenie piperacyliny z tazobaktamem, tikarcylinę, azlocylinę i mezlocylinę. W obrębie grupy cefalosporyn naturalna wrażliwość *S. marcescens* i *S. liquefaciens* występuje u II, III i IV generacji. Przykładami takich antybiotyków są: cefotiam, cefdimir, cefiksym, cefpodoksym, cefoperazon, cefotaksym, ceftybuten, ceftriakson, ceftazydym i cefepim. Testowane antybiotyki imipenem i meropenem z grupy karbapenemów również należały do grupy naturalnej oporności opisywanych pałeczek. Naturalna oporność stwierdzona została dla aztreonamu z grupy monobaktamów oraz ciprofloksacyny, sparfloksacyny, norfloksacyny, ofloksacyny, pefloksacyny i kwasu pipemidynowego z grupy chinolonów. W przeciwieństwie do *S. marcescens*, pałeczka *S. liquefaciens* jest wrażliwa na tetracyklinę i minocyklinę z grupy tetracyklin oraz na tobramycynę z grupy aminoglikozydów [52].

Tabela 2. Antybiotykooporność pałeczek *S. marcescens*

Naturalna oporność	Naturalna wrażliwość	Naturalna wrażliwość/oporność*
TET, OXA, AMX, AMC, SAM, CZN, CEC, CXM, FOX, AZM, ERY, CLR, LCN, CMN, TEC, VAN, RIF, FAD	SXT, CIP, SPX, NXN, OFX, PEF, PIM, ATM, IPM, MEM, CFM, CPD, CPZ, CTX, CTB, CRO, CAZ, FEP, PIP, TZP, TIC, MZN, NET, TOB, AKN, GME, SMN, KMN, NEO, SPT	DOX, MNO, NET, TOB, SAM, FOX

Legenda:

Karbapenemy: IPM - imipenem, MEM – meropenem; Monobaktamy: ATM - aztreonam; **Chinolony:** CIP - ciprofloksacyna, SPX - sparfloksacyna, NXN - norfloksacyna, OFX - ofloksacyna, PEF - pefloksacyna, PIM - kwas pipemidynowy; **Makrolidy:** AZM - azytromycyna, ERY - erytromycyna, CLR - klarytromycyna; Linkozamidy: LCN - likomycyna, CMN - klindamycyna; **Tetracykliny:** TET - tetracyklina, DOX - doksycyklina, MNO - minocyklina; **Aminoglikozydy:** NET - netilmycyna, TOB - tobramycyna, AKN - amikacyna, GME - gentamycyna, SMN - streptomycyna, KMN - kanamycyna, NEO - neomycyna, SPT - spektynomycyna; **Penicyliny:** OXA - oksacylina, AMX - amoksycylina, AMC - amoksycylina z kwasem klawulanowym, SAM - ampicylina/sulbaktam, PIP - piperacylina, TZP - piperacylina/tazobaktam, TIC - tikarcylina, MZN - mezlocylina; **Cefalosporyny:** CEC - cefaklor, CZN - cefazolina, CXM - cefuroksym, FOX - cefoksytyny, CFM - cefiksym, CPD - cefpodoksym, CPZ - cefoperazon, CTX - cefotaksym, CTB - ceftybuten, CRO - ceftriaksom, CAZ - ceftazydym, FEP - cefepim; **Antyfoliany:** SXT - trimetoprim/sulfametoksazol; **Glikopeptydy:** TEC - teikoplanina, VAN - wankomycyna; **Pozostałe antybiotyki:** RIF - rifampicyna, FAD - kwasfusydowy

* Naturalna wrażliwość/oporność oznacza opisaną w tekście średnią oporność lub wrażliwość szczepu na dany antybiotyk.

Opublikowane dane wskazują również, że *S. marcescens* i *S. liquefaciens* [Tab. 2; Tab. 3] wykazują średnią oporność lub wrażliwość na grupy antybiotyków takich jak: doksycyklina i minocyklina z grupy tetracyklin, ampicylina z sulbaktamem i azlocylina z grupy penicylin oraz cefoksytyna z II generacji cefalosporyn. Dodatkowo *S. liquefaciens* jest naturalnie średnio oporna lub średnio wrażliwa na tetracyklinę z grupy tetracyklin oraz na amoksycylinę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym z grupy penicylin. Ta cecha została również opisana dla antybiotyku lorakarbef należącego do II generacji cefalosporyn. *S. marcescens* w przeciwieństwie do *S. liquefaciens*, średnią oporność lub wrażliwość wykazywała względem antybiotyku: netilmycyna i tobramycyna z grupy aminoglikozydów oraz cefotiam i cefdimir z grupy cefalosporyn [52].

Pałeczki *S. marcescens* i *S. liquefaciens* są naturalnie oporne na benzylopenicylinę, oksacylinę, amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym z grupy penicylin. Z grupy cefalosporyn wykazują oporność względem cefakloru, cefazoliny, cefuroksymu, lorakarbef, cefoksytyny z I i II generacji. Wykazują również oporność na azytromycynę, erytromycynę i klarytromycynę

z grupy makrolidów, linkomycynę i klindamycynę z grupy linkozamidów, teikoplaninę i wankomycynę z grupy glikopeptydów oraz rifampicynę i kwas fusydowy. *S marcescens* jest również naturalnie oporna na tetracyklinę [52].

Tabela 3. Antybiotykooporność pałeczek *S. liquefaciens*

Naturalna oporność	Naturalna wrażliwość	Naturalna wrażliwość/oporność*
TEC, VAN, RIF, FAD, TET, OXA, AMX, AML, PIP, TZP, TIC, MZN, CEC, CZN, CXM, FOX, AZM, ERY, CLR, LCN, CMN	SXT, MNO, NET, TOB, AKN, GME, SMN, KMN, NEO, SPT, CFM, CPD, CPZ, CTX, CTB, CRO, CAZ, FEP, IPM, MEM, ATM, CIP, SPX, NXN, OFX, PEF, PIM	TET, DOX, MNO, AMX, AML, SAM, FOX

Legenda: patrz legenda Tab. 2

3.1. Mechanizmy oporności na antybiotyki pałeczek z rodzaju *Serratia*

Za oporność na antybiotyki pałeczek *Serratia* sp. odpowiadają odpowiednie mechanizmy. Dowiedziono, że u tych bakterii geny oporności na antybiotyki zlokalizowane są chromosomie i na plazmidzie bakteryjnym [6].

Jednym z najczęstszych mechanizmów oporności bakterii na aminoglikozydy jest modyfikowanie antybiotyków z tej grupy poprzez enzym N-acetylotransferazę (ACC), O-fosfotransferazę (APH) oraz O-nukleoty-dylotransferazę (ANT). Działanie tych enzymów skutkuje brakiem wiązania się antybiotyku z miejscem docelowym w komórce bakteryjnej. U *S. marcescens* zidentyfikowano również kolejny enzym zapewniający oporność na tą grupę związków antybakteryjnych. Jest nim metylaza 16S rRNA, zwana też RmtB. Występowanie tego enzymu zapewnia oporność *S. marcescens* na amikazynę, kanamycynę, gentamycynę, streptomycynę oraz na tobramycynę. Kolejnym czynnikiem oporności *S. marcescens* na antybiotyki aminoglikozydowe są również metylazy ArmA, RmtC oraz RmtA. Geny kodujące te metylazy zlokalizowane są na plazmidzie. Wspomniany wcześniej enzym ACC (N-acetylotransferaza) jest kodowany przez gen zlokalizowany na chromosomie. Obecność tego enzymu warunkuje oporność na tobramycynę, amikacynę oraz na netylmycynę. Jednakże enzym ten jest ekspresjonowany na niskim lub bardzo niskim poziomie [53].

Oporność *S. marcescens* na antybiotyki z grupy karbapenemów jest warunkowana przez opisaną w 1982 roku karbapenemazę SME-1. Zapewnia ona oporność na antybiotyki imipenem i meropenem. W kolejnych latach zostały opisane następne dwie karbapenemazy: SME-2 i SME-3. Karbapenemazy SME są enzymami klasy A, które posiadają aktynę w miejscu aktywnym. Jednakże enzymy te nie występują często u pałeczek *Serratia* sp. W latach 2005-2007 w Chinach opisano

występowanie kodowanych plazmidowo karbapenemaz KPC-2 u *S. marcescens*. W Nowym Jorku w 2000 roku opisano również przypadek szczepu *S. marcescens*, który posiadał enzym karbapenemazy KPC-3. U tej bakterii stwierdzono również występowanie kodowanego plazmidowo enzymu GES-1, który jest zaliczany do karbapenemaz klasy A. U *S. marcescens* występuje dodatkowo kodowany plazmidowo enzym metalo-β-laktamazy. Przykładami takich enzymów u *S. marcescens* są enzym IMP-1 oraz VIM, który dodatkowo występuje u *S. liquefaciens* [53].

Oporność *Serratia* na chinolony jest możliwa dzięki występowaniu czynników kodowanych plazmidowo oraz chromosomalnie lub też dzięki różnym mutacjom. Przykładem takiej oporności na chinolony jest mutacja genu *gyrA* (ang. *DNA gyrase subunit A*). Bakterie z rodzaju *Serratia* oporność na tę grupę antybiotyków objawiają również poprzez zmiany w białkach błony zewnętrznej. Najczęściej zmiany te dotyczą białka Omp1 (ang. *Outer membrane porin Omp1*). Kolejnym mechanizmem oporności *Serratia* są pompy efflux. U *S. marcescens* zidentyfikowano pompy z rodziny pomp RND (*ang. Resistance-Nodulation-Division*), którymi są SdeAB, SdeXY oraz SdeCDE. U bakterii tej występuje również pompa efflux z rodziny ABC i jest nią pompa SmdAB. Oporność na chinolony u *Serratia* sp. warunkuje obecność genu plazmidowego *gnr*. U *S. marcescens* stwierdzono występowanie genu *gnr*, *gnrA1*, *gnrB1* oraz *gnrB4* [53].

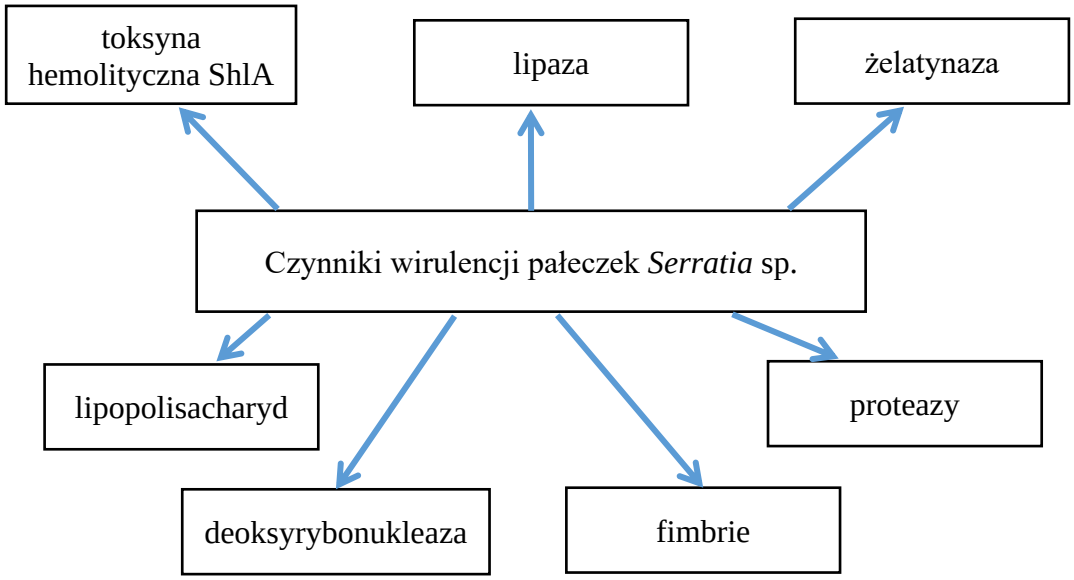
U pałeczek z rodzaju *Serratia* za oporność na antybiotyki β-laktamowe odpowiadają zarówno β-laktamazy typu C jak i inne β-laktamazy. β-laktamazy typu C są kodowane przez gen *ampC* (ang. *Class C beta-lactamase*). Ich cechą unikalną u pałeczek *Serratia* sp. jest obecność długiego obszaru sekwencji poprzedzającej sekwencję genu *ampC*, która nie podlega translacji. Wynikiem tego jest efektywniejsza produkcja enzymu [6]. U *S. marcescens* najczęściej występuje β-laktamaza typu CTX-M, ale mogą również występować β-laktamazy typu ESBL, TEM, SHV oraz BES-1. W Polsce wśród izolatów *S. marcescens* najczęściej spotykane są enzymy CTX-M oraz SHV [53].

Jak dotąd dla antybiotyków z grupy tetracyklin opisano jeden mechanizm oporności, którym jest obecność pomp efflux typu RND. Przykładem takiej pompy u *S. marcescens* jest pompa SdeAB [53].

4. Czynniki wirulencji pałeczek *Serratia sp.*

Bakterie z rodzaju *Serratia* posiadają czynniki wirulencji umożliwiające im kolonizację i przeżycie wewnątrz organizmu gospodarza. W literaturze podawane jest występowanie u *Serratia* sp. czynników wirulencji takich jak: toksyna hemolityczna ShlA, fosfolipaza PhlA, LPS, fimbrie, proteazy, deoksyrybonukleaza, lipaza oraz żelatynaza opisywane w podrozdziałach 5.1-5.7. Schematyczne zestawienie czynników wirulencji u pałeczek *Serratia* sp. przedstawiono na Ryc. 1.

Rycina 1. Czynniki wirulencji u pałeczek *Serratia* sp.



4.1. Toksyna hemolityczna ShlA

Czynnikiem wirulencji występującym u bakterii z rodzaju *Serratia* jest toksyna hemolityczna ShlA. Jest to jedna z rodzajów toksyn hemolitycznych występujących u bakterii z tego rodzaju. Najczęściej jej występowanie jest opisywane dla gatunku *S. marcescens,* jednakże wykrywana jest także u *S. liquefaciens, S. plymuthica, S. grimesii* i *S. rubidaea* [54].

Optymalną temperaturą produkcji toksyny hemolitycznej ShlA jest temperatura 30°C. Produkcja ShlA znacznie spada wraz ze wzrostem temperatury do 37°C. Aktywność toksyny jest zależna również od dostępności żelaza. Gdy stężenie żelaza spada, obserwowany jest wzrost produkcji toksyny, jako odpowiedź na limitujące warunki składników odżywczych w środowisku [55]. Optymalnym czasem do wykrycia aktywności hemolitycznej toksyny jest czas 48 godzin, a optymalną wartością pH do produkcji toksyny jest pH 7 [56].

Toksyna hemolityczna ShlA składa się z białka ShlA oraz białka ShlB, które są kodowane przez geny *shlA* i *shlB*. Białko ShlA odpowiada za efekt toksyczny, natomiast białko ShlB jest zaangażowane w aktywację i translokację białka ShlA przez bakteryjną błonę zewnętrzną. Mechanizmem działania białka ShlA jest tworzenie porów o wielkości 1 nm zarówno w błonach jak i dwuwarstwach lipidowych. Badania nad tą toksyną wykazały, że jest ona związana z komórką. Może być wydzielana do podłoża mikrobiologicznego, ale okres półtrwania aktywności toksyny hemolitycznej wynosi jedynie 3 minuty w temperaturze 37°C, co zostało przedstawione w badaniach Braun et al. w 1993 roku [54].

Aktywność toksyny hemolitycznej ShlA jest ściśle związana z wzajemną relacją białka ShlA z białkiem ShlB. Jak podaje literatura [103], aktywność toksyny jest zależna od białka ShlB. W obecności białka ShlB białko ShlA jest wydzielane na zewnątrz komórki. Natomiast w sytuacji braku obecności białka ShlB,

niehemolityczne białko ShlA gromadzone jest w peryplazmie. Badania eksperymentalne produkcji białka ShlA u *E. coli* wykazały, że przy nieobecności białka ShlB obserwowano brak hemolizy i niską aktywność białka ShlA wewnątrz komórki. Takie wyniki badań sugerują, że białko ShlB ma nie tylko funkcję sekrecyjną, ale również funkcję aktywacyjną [13]. Jednakże udowodniono, że białko ShlB nie jest jedynym czynnikiem niezbędnym do rozpoczęcia procesu aktywacji hemolizyny. Zostało to potwierdzone poprzez badania oczyszczenia i zmieszania in vitro białek ShlA i ShlB. Pomimo występowania białka ShlB, białko hemolizyny ShlA nie było aktywne. Dodatkowym niezbędnym składnikiem do pełnej aktywacji białka ShlA jest fosfatydyloetanoloamina (PE), która jest głównym fosfolipidem błony zewnętrznej [57].

Białko ShlA nie jest wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej zgodnie ze znanymi szlakami dla zewnątrzkomórkowych białek bakterii Gram-ujemnych. W pierwszym etapie białko ShlA dociera do peryplazmy przez system sekrecji Sec. Następnie translokacja tego białka przez błonę zewnętrzną wymaga obecności białka błony zewnętrznej ShlB. Białko ShlB rozpoznaje nieaktywne białko ShlA i aktywuje je poprzez modyfikacje na jego N-końcu. W ostatnim etapie dochodzi do eksportu aktywnego białka ShlA na zewnątrz komórek bakteryjnych [54].

Występowanie powyżej opisanego mechanizmu jest bardzo istotne w kontekście komórek bakterii, które posiadają ten typ toksyny. Jak udowodniono na przykładzie *E. coli*, aktywne białko ShlA jest w stanie niszczyć komórkę bakterii producenta. Zatem synteza nieaktywnego białka ShlA, które jest następnie wydzielane poprzez białko błony zewnętrznej jest prawdopodobnie mechanizmem zapobiegania samozniszczenia komórki bakterii [54].

Toksyna hemolityczna ShlA jest dobrze przebadaną toksyną tworzącą pory. Ma ona działanie hemolityczne i cytotoksyczne na komórki organizmu gospodarza. Jest ona również kluczowym czynnikiem warunkującym inwazję komórek [58]. Udowodniono, że hemolizyna ShlA jest cytotoksyczna względem erytrocytów, fibroblastów oraz komórek nabłonkowych [54].

4.2. Fosfolipaza A1 (PhlA)

Drugim typem toksyny hemolitycznej u pałeczek z rodzaju *Serratia* jest fosfolipaza A1 (PLA). To zewnątrzkomórkowa hemolizyna, której zadaniem jest degradacja fosfolipidów, co prowadzi do destabilizacji błony komórkowej erytrocytów [3]. Dla tego rodzaju bakterii zostały opisane dwa rodzaje fosfolipazy A: PhlA u *S. marcescens* oraz Pla u *S. liquefaciens*. Jednakże PhlA jest również notowana u *S. liquefaciens*. Z toksyną hemolityczną PhlA są związane są białka PhlA i PhlB, które są kodowane przez geny *phlA* oraz *phlB*. PhlA hydrolizuje wiązanie estrowe w miejscu sn-1 fosfolipidów, co oznacza, że należy do grupy fosfolipaz A1 [59].

Fosfolipaza jest enzymem katalizującym rozpad fosfolipidów, obecnych w błonach erytrocytów, na kwasy tłuszczowe oraz lizofosfolipid. Prowadzone badania udowodniły obecność kwasów tłuszczowych po inkubacji PhlA m.in.

z fosfatydylocholiną, kardiolipiną, fosfatydyloetanolaminą oraz z sfingomieliną [59].

Lizofosfolipid oraz kwasy tłuszczowe mają bardzo duże oddziaływanie na błonę zewnętrzną erytrocytów. Jak podaje literatura, główny mechanizm działania fosfolipazy polega na destabilizacji błony erytrocytów poprzez powstanie lizofosfolipidu oraz kwasów tłuszczowych. Tak więc, PhlA sama w sobie nie wykazuje działania toksycznego [59].

PhlA może również hydrolizować PE (fosfatydyloetanoloaminę), która jest wymagana do aktywacji ShlA. Oznacza to, że PhlA może potencjalnie regulować aktywność ShlA. Fosfolipaza A1 u *Serratia* sp. jest ekspresjonowana w temperaturze 37°C, ale jej regulacja nie została jeszcze dokładnie opracowana. Wysoki stopień homologii PhlA *S. marcescens* do YplA *Y. enterocolitica* sugeruje, że fosfolipaza może odgrywać rolę w kolonizacji organizmu gospodarza [59].

Dostępne dane literatury sugerują również, że białko PhlB jest inhibitorem białka PhlA wewnątrz komórki bakteryjnej, w której jest produkowana. Ma ono zadanie zapobiegania aktywności PhlA, aż do jej uwolnienia na zewnątrz komórki [59].

4.3. Lipopolisacharyd (LPS)

Lipopolisacharyd stanowi od 70 do 75% powierzchni komórki bakterii Gram-ujemnych. Struktura ta spełnia jednocześnie funkcje ochronne komórek bakteryjnych przed działaniem układu immunologicznego organizmu gospodarza oraz funkcje obronne, ponieważ uważana jest za istotny czynnik wirulencji bakterii Gram-ujemnych. Stryktura ta zbudowana jest z trzech głównych części: lipidu A, rdzenia oligosacharydowego oraz O-swoistego łańcucha, który nazywany jest również antygenem O. Cechą charakterystyczną O antygenu są powtarzające się podjednostki O-swoiste [60].

Najbardziej wewnętrzną częścią LPS-u jest lipid A, którego funkcją jest kotwiczenie lipopolisacharydu w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Jest to struktura, która do niedawna była uważana za element konserwatywny cząsteczki LPS. Jednakże udowodniono, że lipid A może podlegać pewnym modyfikacjom u różnych gatunków bakterii. Wiadomo jednak, że zmianom nie podlega część cukrowa lipidu A, co czyni ją elementem konserwatywnym. Ta część struktury LPS odpowiada za jej efekt toksyczny [60].

Kolejnym elementem składowym cząsteczki LPS jest rdzeń oligosacharydowy, który jest połączony wiązaniem ketozydowym z lipidem A. Zawiera on region wewnętrzny oraz region zewnętrzny. Region wewnętrzny zbudowany jest z kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo) oraz z heptoz. Z kolei region zewnętrzny tworzony jest przez galaktozę i glukozę [61].

Strukturą zlokalizowaną najbliżej środowiska zewnętrznego komórki bakteryjnej jest łańcuch O-swoisty (antygen O). To heteropolisacharyd, który tworzony jest z kilkunastu do kilkudziesięciu podjednostek polisacharydowych. O-swoisty łańcuch LPS jest charakterystyczny dla określonych szczepów bakterii, co

jest wykorzystywane podczas określania swoistości serologicznej. Różnice w składzie O-swoistego łańcucha LPS dotyczą przeważnie składu chemicznego, występowania niecukrowych podstawników, sekwencji ułożenia oraz typem wiązania pomiędzy poszczególnymi cukrami, czy też odgałęzieniami bocznymi [60,61]. Antygen O jest również składnikiem, który wykorzystywany jest przez bakterie do przetrwania wewnątrz organizmu gospodarza. Dzięki niemu mogą one unikać procesu fagocytozy oraz bakteriobójczego działania układu dopełniacza [60].

Bakterie Gram-ujemne mogą syntetyzować cząsteczkę LPS o różnych długościach O-swoistego łańcucha. Szczepy o gładkim LPS (S-LPS, ang. *smooth* LPS) posiadają lipopolisacharyd zbudowany z lipidu A, rdzenia oraz O-swoistego łańcucha zbudowanego z wielu powtarzających się podjednostek. Szczepy o półszorstkim typie LPS (SR-LPS, ang. *semi-rough* LPS) syntetyzują endotoksynę zbudowaną z lipidu A, rdzenia oraz jednej podjednostki polisacharydowej. Natomiast u szczepów bakteryjnych z szorstkim LPS (R-LPS, ang. *rough* LPS) struktura ta posiada jedynie lipid A oraz część rdzeniową [60].

Lipopolisacharyd jest endotoksyną, a jego obecność we krwi może prowadzić do wystąpienia posocznicy w organizmie gospodarza. Działanie LPS jako endotoksyny polega na stymulowaniu komórek układu odpornościowego do produkcji m.in. czynnika TNF-α, czynnika PAF, prostaglandyn, czy też interleukin (IL-1, IL-6, IL-8). W sytuacji nagromadzenia się endotoksyny w organizmie dochodzi do zwiększonej reakcji układu immunologicznego, czego efektem jest wystąpienie wstrząsu septycznego [61].

Cząsteczka LPS jest również jednym z czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych zapewniających im oporność na działanie ludzkiej surowicy. Wiele przeprowadzonych badań sugeruje, że oporność bakterii na działanie surowicy ma związek z długością O-swoistego łańcucha LPS. Szczepy posiadające gładki LPS są częściej oporne na działanie surowicy w porównaniu ze szczepami o szorstkim LPS [60].

4.4. Fimbrie

Czynnikiem wirulencji, którego głównym zadaniem jest warunkowanie adhezji są fimbrie. Występują one na powierzchni komórek bakterii należących do różnych rodzajów. U bakterii należących do rzędu *Enterobacterales* w większości występują fimbrie typu I. Zbudowane są z białka strukturalnego - piliny. Na końcu fimbrii znajduje się białko adhezyjne (FimH), które wiąże się z receptorami na powierzchni komórek gospodarza. Fimbrie typu I noszą również nazwę mannozo-wrażliwych (MS - *ang. mannose-sensitive*). Oznacza to, że warunkowana przez nie aglutynacja jest hamowana przez mannozę [62]. Z kolei fimbrie typu III są określane jako mannozo-oporne [33].

U *Serratia* sp. fimbrie kodowane są przez chromosomalny gen *fimA*. Struktury te pomagają w przyleganiu do wielu powierzchni, w tym również do komórek nabłonkowych [63].

W praktyce każdy szczep z rodzaju *Serratia* produkuje od jednego do trzech typów fimbrii hemaglutynacyjnych HA. Fimbrie typu I wytwarzają wszystkie kliniczne izolaty *S. marcescens* i inne gatunki *Serratia* z wyjątkiem *S. plymuthica* i *S. fonticola*. Fimbrie typu III natomiast, są produkowane przez prawie wszystkie gatunki z rodzaju *Serratia* [33].

4.5. Regulator wirulencji FlhCD

Białka FlhC i FlhD tworzą heterodimer, który jest głównym regulatorem produkcji rzęsek u licznych bakterii jelitowych takich jak np. *E. coli*, *S.* Typhimurium, *P. mirabilis* i *Y. enterocolitica*. FlhDC są ważne w kontrolowaniu czynników ruchliwości i wirulencji pałeczek Gram-ujemnych. Wykazano, że u *S. marcescens* FlhDC pozytywnie regulują produkcję rzęsek oraz nukleazy, fosfolipazy A oraz toksyny ShlAB. Badania pokazują również, że FlhDC negatywnie wpływa na tworzenie biofilmu przez *S. marcescens*. Transkrypcja FlhDC u *S. marcescens* jest ujemnie i bezpośrednio regulowana przez dwuskładnikowy system RssAB i RcsB oraz dodatnio i bezpośrednio regulowana przez cykliczne białko receptorowe AMP. Badania prowadzone na *Galleria mellonella* udowodniły, że zwiększona ekspresja FlhDC spowodowała większą cytotoksyczność komórek *S. marcescens* [58].

4.6. Proteazy

Jednym z czynników wirulencji umożliwiających bakteriom penetrację tkanek organizmu gospodarza są proteazy. Wywołane przez proteazy zaburzenia mechanizmów, które kontrolują aktywność kaskad kalikreino-kininowych umożliwiają wnikanie m.in. *Serratia* do organizmu gospodarza. Dzieje się to poprzez zaburzenie przepuszczalności błon. W opisywanych wcześniej infekcjach rogówki wywołanych przez *Serratia* produkujących proteazy dowiedziono, że doprowadzają one do trwałych uszkodzeń tkanek poprzez degradację fibronektyny, kolagenu i elastyny. Proteazy bakteryjne oddziałują również na układ immunologiczny gospodarza. Mogą one inaktywować czynnik C5a hamując aktywację neutrofili oraz niszczyć przeciwciała IgA, IgG oraz IgM, dzięki czemu bakterie unikają fagocytozy [64].

Pierwszą opisaną u bakterii *Serratia* sp. proteazą była proteaza o masie 56 kDa. Ogólnie dla bakterii z rodzaju *Serratia* zostały opisane 4 proteazy, dwie metaloproteazy o masach 56 kDa i 60 kDa oraz dwie proteazy tiolowe o masie 73 kDa [33]. W kolejnych latach podano, że główną proteazą *S. marcescens* jest serralizyna PrtS. Opisano również trzy kolejne proteazy: SlpB, SlpC oraz SlpD. Jak wykazano, proteaza SlpB ma silne działanie cytotoksyczne na linie komórkowe ludzkich nowotworów [43]. Wykazano, że proteazy odgrywają znaczącą rolę w patogenezie zapalenia płuc i rogówki oka. Udowodnionymi działaniami proteaz produkowanych przez *Serratia* sp. jest powodowanie martwiczego zapalenia rogówki oraz inaktywacja pięciu głównych inhibitorów proteinaz (α_1-proteinazy, α_2-

makroglobuliny, inhibitora Cl, α_2-antyplazminy i antytrombiny III), które uczestniczą w regulacji różnych mechanizmów, w tym m. in. kaskadowej aktywacji białek dopełniacza. Proteazy są w stanie również degradować immunoglobulinę A i G, fibronektynę oraz inne białka surowicy. Mają one również działanie toksyczne na fibroblasty, inicjują kaskadę czynników zapalnych, co skutkuje wzrostem przepuszczalności w naczyniach krwionośnych, czego efektem jest ułatwienie penetracji tkanek gospodarza. Wynikiem działania proteaz jest również rozpad białek C3 i C5 układu dopełniacza [33].

4.7. Deoksyrybonukleaza, lipaza, żelatynaza

Oprócz opisanych enzymów zewnątrzkomórkowych tj. hemolizyny oraz proteazy, pałeczki *Serratia* sp. wytwarzają dodatkowo enzymy: chitynazę, nukleazę, żelatynazę oraz lipazę. Enzym chitynaza nie odgrywa roli w procesie patogenezy powodowanej przez *Serratia* u ludzi. Spełnia on natomiast ważną rolę w udziale *Serratia* w obiegu materii w przyrodzie [6].

Zewnątrzkomórkowa nukleaza produkowana przez pałeczki *Serratia* sp. określana jest również jako deoksyrybonukleaza. Enzym ten hydrolizuje cząsteczki DNA i RNA. Do aktywności tej nukleazy wymagana jest obecność w środowisku dwuwartościowych jonów magnezu (Mg^{2+}), optymalną temperaturą jej aktywności jest temperatura pomiędzy 35°C a 44°C oraz wartość pH od 6 do 10. Sugerowano, że może być ona potencjalnym czynnikiem wirulencji, jednakże badania to potwierdzające nie zostały dotąd przeprowadzone [65].

Lipazy to enzymy określane również jako hydrolazy acyloglicerolowe (ES 3.1.1.3). Hydrolizują one wiązanie karboksyloestrowe obecne w acyloglicerolach powodując ich rozpad na kwasy organiczne oraz glicerol [66]. Mają one szerokie zastosowanie w przemyśle przy usuwaniu zabrudzeń, przy procesie oczyszczania ścieków, produkcji leków czy też kosmetyków [67]. Jednakże enzymy te są również wykorzystywane przez bakterie patogenne do ułatwienia kolonizacji i przeżycia wewnątrz organizmu gospodarza. Lipazy biorą udział w ułatwianiu penetrowania błon białkowo-lipidowych w komórkach gospodarza. Enzymy te są produkowane przez bakterie z rodzaju *Serratia*, ale mogą być również syntetyzowane przez m.in. bakterie z rodzaju *Pseudomonas* oraz *B. subtilis* i *S. aureus* [66,6].

Jedną z cech charakterystycznych pałeczek z rodzaju *Serratia* jest produkcja zewnątrzkomórkowego enzymu – żelatynazy. Enzym ten występuje również u innych Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* i *Enterobacter* spełniając kluczowe role w ich wirulencji. Żelatynazy to zewnątrzkomórkowe proteazy, które powodują dwustopniowy rozkład żelatyny. W pierwszym etapie żelatyna rozkładana jest do polipeptydów, a w drugim polipeptydy do aminokwasów. Tak uzyskane aminokwasy mogą być wykorzystywane przez bakterie do różnych procesów metabolicznych [68]. Enzym żelatynaza hydrolizuje również hemoglobinę, kolagen oraz kazeinę. Wynikiem działania tego enzymu w organizmie gospodarza jest powstanie zmian chorobowych w tkankach. W wyniku rozpadu kolagenu dochodzi

do uszkodzeń prozapalnych poprzez aktywację komórek układu odpornościowego, aktywację enzymów litycznych oraz produkcję reaktywnych form tlenu [69].

5. Wyczuwalność liczebności bakterii (*ang. Quorum sensing*) u *Serratia* sp.

„Quorum sensing" jest sygnalizatorem zagęszczenia komórek oraz bardzo dobrze znanym mechanizmem porozumiewania się bakterii. Jednakże mechanizm ten jest również zaangażowany w wiele procesów w komórce bakteryjnej. Ich przykładem jest m. in. produkcja toksyn, barwników, antybiotyków lub też ruchliwość bakterii [70].

W procesie komunikacji między bakteriami biorą udział autoinduktory, czyli małe cząsteczki sygnalizacyjne. W momencie osiągnięcia przez bakterie odpowiedniej liczebności wzrasta również stężenie autoinduktorów oraz następuje skoordynowana ekspresja wybranych genów. U bakterii Gram-ujemnych najbardziej powszechnymi autoinduktorami są cząsteczki AHL (ang. Acyl-L-homoserine lactone-AHL). System QS polega na współdziałaniu ze sobą cząsteczek AHL, białek LuxI oraz LuxR oraz genów docelowych. Białka LuxI odpowiadają za syntezę cząsteczek AHL, natomiast białka LuxR są odpowiedzialne za rozpoznanie oraz wiązanie cząsteczek AHL. Pośredniczy ono również w aktywacji transkrypcji genów docelowych [71].

U bakterii z rodzaju *Serratia* wykazano obecność kilku systemów homologicznych do systemu Lux innych bakterii Gram-ujemnych. System SwrI/SwrR warunkuje poruszanie się bakterii typu „swarming motility", produkcję serrawertyny, proteaz, warstwy S oraz tworzenie biofilmu. Kolejny zdefiniowany system SpnI/SpnR reguluje poruszanie się bakterii typu „slinding motility", produkcje biosulfaktantu, barwnika prodigiozyny i enzymu nukleazy. Ostatni opisywany dla *Serratia* sp. system QS to system SmaI/SmaR, którego zadaniem jest warunkowanie ruchu bakterii typu „swarming motility", aktywności hemolitycznej, produkcję kazeinazy, chitynazy oraz tworzenie biofilmu [72].

6. Oporność pałeczek *Serratia* sp. na działanie ludzkiej surowicy

Układ immunologiczny organizmu gospodarza stanowi podstawową barierę ochronną przed różnego rodzaju patogenami. Jego podstawową funkcją jest nie tylko zapewnianie ochrony w momencie kontaktu z patogenem, ale również nabycie odporności organizmu przed kolejnymi kontaktami w przyszłości. Wyróżnia się dwa rodzaje odpowiedzi immunologicznych: wrodzoną oraz nabytą. Występują one zarówno w postaci humoralnej, jak i komórkowej. Różnią się pomiędzy sobą aktywnością immunologlobulin (postać humoralna) oraz aktywnością komórek układu immunologicznego (postać komórkowa) [73].

Wczesna odpowiedź immunologiczna organizmu gospodarza jest możliwa dzięki obecnym w surowicy przeciwciałom oraz obecności makrofagów, monocytów i granulocytów o działaniu fagocytarnym oraz komórek NK o działaniu

cytotoksycznym. Bardzo ważną częścią wrodzonej odpowiedzi naszego układu immunologicznego jest również układ dopełniacza [73].

Układ dopełniacza, którego główną funkcją jest obrona organizmu przed atakiem ze strony mikroorganizmów, tworzony jest przez około 40 białek krwi. Działanie tego układu jest możliwe poprzez ułatwienie fagocytozy komórek mikroorganizmów, naprowadzanie komórek żernych do miejsca infekcji oraz usuwanie uszkodzonych lub zmodyfikowanych komórek organizmu gospodarza. Ponadto odpowiada za lizę komórek bakterii i wirusów oraz m.in. indukcję reakcji zapalnej [73].

Dopełniacz aktywowany jest kaskadowo trzema różnymi drogami: klasyczną, alternatywną oraz lektynową. Klasyczna droga aktywacji układu dopełniacza inicjowana jest przez przeciwciała IgM oraz IgG1-3. Drogę klasyczną rozpoczyna połączenie się białka C1q z regionem Fc immunoglobuliny, która jest związana z antygenem. Sama proteina C1 czasami może być aktywowana przez białko C-reaktywne, LPS (lipopolisacharyd), MBL (ang. *Mannose-Binding Lectin*) lub też przez niektóre wirusy. W alternatywnej drodze układu dopełniacza biorą udział czynniki B, D, H, I i P oraz składnik C3. Do aktywacji tej drogi nie jest wymagany udział przeciwciał, a jej stymulacja może nastąpić poprzez m.in. komórki bakteryjne, wirusy, komórki grzybów lub też komórki nowotworowe. Za inicjatora drogi alternatywnej uważany jest enzym konwertaza C3. Lektynowa droga układu dopełniacza aktywowana jest przez białko wiążące mannozę - MBP (ang. *Mannose-Binding Protein*), które jest również nazywane lektyną wiążącą mannozę. Białko MBL, oprócz aktywowania układu dopełniacza, ułatwia fagocytozę mikroorganizmów. Dzieje się to poprzez obecność na powierzchni makrofagów receptorów dla tego białka. Końcowym etapem każdej drogi aktywacji układu dopełniacza jest powstanie kompleksu atakującego błonę MAC (ang. *Membrane Attack Complex*). Efektem działania konwertazy C5 jest powstanie białka C5b, do którego przyłączane są kolejne składniki C6, C7, C8 oraz C9. Utworzony w ten sposób zespół C5b6789 tworzy kanał i jest nazywany kompleksem atakującym błonę MAC (*ang. Membrane Attack Complex*) [73].

Oporność na bakteriobójcze działanie surowicy to jeden z kluczowych czynników wirulencji bakterii. W celu unikania wywołania odpowiedzi ze strony układu immunologicznego organizmu gospodarza w komórkach bakteryjnych dochodzi do zmian ich struktur zewnątrzkomórkowych. Najczęściej są nimi białka błony zewnętrznej (OMP), lipopolisacharyd (LPS) oraz lipooligosacharyd (LOS). Bakterie wykształciły wiele różnych mechanizmów oporności na działanie układu dopełniacza. Jednym z nich jest „maskowanie" struktur, które aktywują dopełniacz (LPS, otoczka, LOS), albo tworzenie gładkiego typu LPS, który aktywuje dopełniacz poza komórką bakteryjną. Bakterie posiadają również struktury o charakterze proteaz, które rozkładają czynniki składowe dopełniacza oraz immunoglubuliny. W oporności na mechanizmy aktywacji układu dopełniacza jest również wytworzenie niektórych białek błony zewnętrznej, które chronią komórkę przed działaniem kompleksu MAC [73].

Opublikowanych badań dotyczących wrażliwości bakterii na działanie dopełniacza z rodzaju *Serratia* sp. jest niewiele. Jednakże przykłady takich badań zostały przedstawione w 1979 roku [33] oraz w 2001 roku [74], co zostało dogłębniej opisane poniżej.

Oporność bakterii z rodzaju *Serratia* na działanie ludzkiej surowicy przebadali w 1979 roku Traub i Fukushima [33]. Według ich badań kliniczne szczepy *S. marcescens* zostały podzielone na trzy kategorie w odniesieniu do jej oporności na 80% surowicę ludzką. Pierwszą kategorię stanowiły *S. marcescens* wrażliwe na surowicę z opóźnieniem. Szczepy te były zabijane przez alternatywną drogę aktywacji dopełniacza po kilkugodzinnej ekspozycji na surowicę. Druga kategoria szczepów to szczepy wrażliwe na surowicę, które były zabijane po kilkuminutowej ekspozycji. Ostatnia kategoria to szczepy *S. marcescens* oporne na surowicę [33].

W 2001 roku [74] przeprowadzono inne badania dotyczące oporności na surowicę klinicznych izolatów *S. marcescens*. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że większość testowanych izolatów *S. marcescens* było opornych na działanie 50% surowicy. Podczas przeprowadzenia dokładniejszych analiz wykazano, że aktywny dopełniacz odkładał się na powierzchni wszystkich komórek bakteryjnych. Występowanie kompleksu MAC stwierdzono wyłącznie na powierzchni szczepów opornych na działanie surowicy. Podczas tych badań wykazano również, że wszystkie izolaty *S. marcescens* aktywowały dopełniacz zarówno drogą klasyczna, jak i alternatywną. Dodatkowo udowodniono, że szczepy oporne na surowicę posiadały na powierzchni swojej komórki fragment cząsteczki iC3b, co wskazuje na mechanizm oporności na surowicę podobny do mechanizmu *Yersinia enterocolitica* [74].

7. Inne mechanizmy wirulencji bakterii z rodzaju *Serratia* sp.

U pałeczek z rodzaju *Serratia* opisano właściwości hydrofobowe komórek CSH (ang. *Cell Surface Hydrofobicity*), które określane są jako niespecyficzne czynniki wirulencji warunkujące adhezję tych bakterii. Spełniają one kluczowe role podczas adhezji *Serratia* sp. w drogach moczowych. Adhezyjną rolę spełniają dodatkowo przy kolonizacji *Serratia* sp. podczas stosowania soczewek kontaktowych [6].

Dostępność żelaza jest istotna w procesach obrony mikroorganizmów przed odpowiedzią ze strony organizmu gospodarza. Jego dostępność warunkuje ekspresję genów, które kodują czynniki wirulencji bakterii. Bakterie patogenne, których przykładem jest m. in. *Serratia* sp., korzystają z żelaza dostępnego wewnątrz organizmu gospodarza. Najlepszym źródłem żelaza dla bakterii patogennych jest hem, który pochodzi z uszkodzonej hemoglobiny. Pozyskiwanie hemu odbywa się z wykorzystaniem określonych transporterów błonowych, które u bakterii Gram-ujemnych transportują hem przez błonę zewnętrzną i błonę cytoplazmatyczną. U bakterii *S. marcescens* do takich transporterów należą białka rozpoznające i pobierające hem znajdujący się w kompleksie z hemoforem, czyli białkiem wytwarzanym przez bakterie do środowiska i wiążącym się z hemem. Następnie

zadaniem hemoforów jest transport hemu do receptorów na powierzchni błony zewnętrznej bakterii [75]. U *S. marcescens* zostały scharakteryzowane dwa systemy Hem i Has, które zaangażowane są w pozyskiwanie żelaza. Operon hem koduje receptor błony zewnętrznej HemR, który importuje żelazo usuwając go bezpośrednio z hemu. Operon Has koduje białko HasA, który wydobywa cząsteczki żelaza z hemu, a następnie utworzony kompleks HasA z żelazem jest wiązany przez receptor HasR. U bakterii z rodzaju *Serratia* sp. opisano również występowanie sideroforów, które chelatują żelazo. U *S. marcescens* jest nim serratiochelina, natomiast u *S. liquefaciens* udowodniono występowanie sideroforu aerobaktyny [76].

8. Miejsca występowania i źródła izolacji pałeczek *Serratia* sp.

Pałeczki z rodzaju *Serratia* występują w wielu środowiskach - są obecne w wodzie, glebie i na powierzchniach roślin. W prowadzonych w 2021 roku w Polsce badaniach, w których uczestniczyła Doktorantka, udowodniono występowanie *S. liquefaciens* u storczyka *Epipactis helleborine* [77]. Ich występowanie potwierdzono również u ludzi oraz u zwierząt. W pracy opublikowanej w 2006 roku przez Grimont i wsp. [33] przedstawiono zestawienie pokazujące częstość występowania kilku wybranych gatunków z rodzaju *Serratia* w różnych źródłach. Przedstawione informacje dotyczyły m.in. gatunków *S. marcescens, S. liquefaciens, S. plymuthica, S. proteamaculans* oraz *S. grimesii, S. rubidea, S. odorifera* i *S. ficaria*. Od małych ssaków, w szczególności gryzoni i ryjówek, najczęściej izolowanymi gatunkami były *S. liquefaciens* (43%) i *S. proteamaculans* (39%). U zwierząt potwierdzono również występowanie pałeczek *S. marcescens, S. plymuthica* i *S. grimesii*. Podobną izolację stwierdzono na terytoriach bytowania tych zwierząt, co potwierdza izolację tych samych gatunków *Serratia* sp. od zwierząt oraz z ich środowiska. Występowanie wspomnianych wcześniej gatunków potwierdzono zarówno w wodzie i w glebie. Spośród ponad tysiąca izolatów *Serratia* sp. izolowanych od pacjentów z różnymi schorzeniami najczęściej opisywany był gatunek *S. marcescens* stanowiący 97% izolacji oraz gatunek *S. liquefaciens,* przyczym *S. liquefaciens* izolowana była z mniejszą częstością wynoszącą 2% [33].

Występowanie *Serratia* sp. u owadów potwierdzono na przykładzie świerszczy (*Gryllidae*), koników polnych (*Chorthippus biguttulus*), termitów (*Isoptera*), chrząszczy (*Coleoptera*), ryjkowców (*Curculionoidea*), ćmy (*Hetero-cera*), pszczół (*Apis*), os (*Vespula*) oraz much (*Musca*). Większość z izolowanych *Serratia* sp. należało do gatunków *S. marcescens* i *S. liquefaciens* [33].

Serratia sp. były izolowane od żółwia domowego (*Pseudemys scripta elegans*), od gekonów (*Gekkonidae*) oraz od lisa rudego (*Vulpex vulpex*). Stwierdzono również, że *Serratia* sp. występowały u myszarki zaroślowej (*Apodemus sylvaticus*), nornika zwyczajnego (*Microtus arvalis*), nornicy rudej (*Myodes glareolus*), badylarki pospolitej (*Micromys minutus*), ryjówki (*Sorex*) oraz ziębełka (*Crocidura*) [33].

Pałeczki z rodzaju *Serratia* występują również u dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), co potwierdzono w badaniach Lessa i wsp. w 2011 roku [78]. W wyniku

prowadzonych badań określających mikroflorę dzików stwierdzono obecność u tych zwierząt *Serratia* sp. Stanowiły one zdecydowaną większość izolowanych bakterii z rodziny *Yersiniaceae* zostały wyizolowane z przewodu słuchowego, jamy nosowej, jamy ustnej oraz narządów rodnych. W zdecydowanej większości izolowanym gatunkiem była *S. marcescens* [78].

Występowanie bakterii z rodzaju *Serratia* udowodniono również u saren. Na Słowenii w 2017 i 2021 roku odnotowano izolację pałeczek *S. fonticola* i *S. marcescens* od kozła i rocznego osobnika sarny [79,80].

Pałeczki z rodzaju *Serratia* izolowane są również z mięsa. W 2016 roku w Niemczech prowadzono badania identyfikujące bakterie powodujące psucie się mięsa drobiowego pakowanego w modyfikowanej atmosferze. Mięso drobiowe ze względu na na swoją specyfikę jest bardziej narażone na zanieczyszczenia w porównaniu do mięs innego rodzaju. Psucie się mięsa drobiowego występuje od około 4 do 10 dni po uboju pomimo przechowywania w niskich temperaturach. Natomiast za psucie się mięsa odpowiada prawdopodobnie mikroflora autotochtoniczna. Wyniki badania wykazały obecność *Serratia* sp. w mięsie przechowywanym w warunkach modyfikowanej atmosfery z podwyższoną zawartością tlenu w temperaturze 10°C oraz w mięsie przechowywanym w warunkach zmienionej atmosfery z niską zawartością tlenu w temperaturze 4°C [81].

Jakość mikrobiologiczna mięsa zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia podczas uboju, potencjalnego zanieczyszczenia mięsa podczas uboju i przetwórstwa oraz od warunków jego przechowywania. Do tej pory różne rodzaje bakterii z rzędu *Enterobacteriales* były izolowane ze skór, tusz i mięsa zwierząt oraz z różnych powierzchni w rzeźni i próbek środowiskowych w zakładach przetwórstwa mięsnego. Do izolowanych rodzajów należały m. in. *Pseudomonas, Enterobacter, Proteus* oraz *Serratia*. Grupa ta powszechnie występuje w świeżej i mrożonej wołowinie, wieprzowinie i innych rodzajach mięs. W Grecji w 2011 roku udowodniono dominowanie występowania *S. liquefaciens* w mielonym mięsie wołowym przechowywanym w warunkach tlenowych i pakowanym w modyfikowanych atmosferach. Dodatkowo w badaniu oznaczono występowanie *S. proteamaculans* oraz innych *Serratia* sp. W świeżo mielonej wołowinie stwierdzono występowanie *S. liquefaciens* i *S. proteamaculans,* natomiast w dalszych procesach przechowywania występowała tylko *S. liquefaciens* [82].

W Niemczech w 2012 roku [83] badano występowanie opornych na antybiotyki *Enterobacteriales* izolowanych z kurczaków oraz z mięsa wieprzowego zakupionych w rzeźni oraz w sprzedaży detalicznej w Bawarii. Ze względu na zachowanie złej higieny pracy z mięsem zwierząt oraz brak utrzymania czystości stanowiska w rzeźni może dojść do zanieczyszczenia mięsa bakteriami, w tym bakteriami opornymi na antybiotyki. Próbując określić potencjalną drogę lub źródło zanieczyszczenia mięsa badano 500 prób mięsa drobiowego i wieprzowego pochodzącego bezpośrednio z uboju jak i mięsa przeznaczonego do sprzedaży. Wyniki badań pokazały izolację *Serratia* sp. z mięsa drobiowego rzędu 5,2% oraz 41,6% z mięsa drobiowego przeznaczonego do sprzedaży. Podobne wyniki uzyskano z badania mięsa wieprzowego. W mięsie wieprzowym bezpośrednio po uboju występowało 3,5%

izolatów z rodzaju *Serratia* sp., natomiast w mięsie przeznaczonym do sprzedaży występowało 21,3% izolatów *Serratia* sp. Duży odsetek uzyskanych bakterii z rodzaju *Serratia* należało do gatunku *S. marcescens* opornego na większość testowanych antybiotyków. Pojedyncze izolaty *S. marce-scens* pozyskane od kurcząt były oporne na doksycyklinę, imipenem, piperacylinę tobramycynę oraz piperacylinę z tazobaktamem, natomiast pięć izolatów było opornych na spektynomycynę. Spośród wszystkich izolatów *S. marcescens* uzyskanych z mięsa wieprzowego tylko jeden izolat był oporny na imipenem. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że do zanieczyszczenia mięsa bakteriami z rodzaju *Serratia* doszło prawdopodobnie na linii produkcyjnej mięs [83].

Badanie dojrzewających fermentowanych wędlin wydaje się równie ważne jak badanie innych rodzajów mięs. W 2007 roku w Hiszpanii [84] przeprowadzono badania mające na celu identyfikację bakterii występujących w hiszpańskiej kiełbasie wieprzowej - androlli. W produkcji wędlin długodojrzewających bardzo ważny jest udział odpowiednich grup mikroorganizmów takich jak bakterii kwasu mlekowego oraz bakterii z rodziny *Micrococcaceae* i *Staphylococcaceae*, które rozwijają się w wędlinach podczas ich dojrzewania. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że w większości analizowanych kiełbas występowała *S. liquefaciens*. Dodatkowo była ona izolowana w ostatnich etapach dojrzewania, co sugeruje, że może rozwijać się w trudnych warunkach. Oprócz pałeczek *S. liquefaciens* izolowano również *S. marcescens*, ale z mniejszą częstością. Przeprowadzone badania potwierdziły występowanie rodzaju *Serratia* w surowych, dojrzewających kiełbasach. Dodatkowo dla *S. liquefaciens* notowane były właściwości proteolityczne, które wiązane są z psuciem się produktów spożywczych, przykładowo pakowanych próżniowo flaków [84].

Kolejne doniesienia dotyczące występowania pałeczek *Serratia* sp. w mięsie opisywano w Finlandii w 2013 roku [85], w Chinach w 2017 roku [86] oraz w Japonii w 2021 roku [87]. Według literatury w mięsie przechowywanym w warunkach chłodniczych mogą występować gatunki bakterii jak *Pantoea agglomerans, Yersinia enterocolitica* oraz *Rahnella* sp. i *Serratia* sp. Dodatkowo niektóre gatunki (*S. liquefaciens, Hafnia alvei, P. agglomerans*) są powiązane z psuciem mięsa obserwowanym jako pęcznienie opakowań, zielone zabarwienia mięsa oraz nieprzyjemny zapach. W Finlandii przeprowadzone porównawcze badania występowania bakterii w surowym i marynowanym mięsie wieprzowym, wołowym i drobiowym. We wszystkich próbach mięs dominującym rodzajem bakterii był rodzaj *Serratia*. W surowym mięsie wieprzowym i wołowym na 138 prób, bakterie z rodzaju *Serratia* zidentyfikowano w 85 próbach, natomiast w 84 próbach marynowanego mięsa - *Serratia* sp. zidentyfikowano tylko w 7 próbach. W surowym mięsie drobiowym rodzaj *Serratia* oznaczono w 24/158 prób, z kolei w mięsie marynowanym stwierdzono obecność *Serratia* sp. w 12/142 prób [85]. W Chinach analizowano bakterie powodujące psucie się mięsa drobiowego w warunkach chłodniczych. W badanym mięsie wykryto pałeczki *S. liquefaciens* [86]. Natomiast w Japonii badano mikroflorę japońskiej czarnej wieprzowiny przechowywanej w niskich temperaturach i udowodniono występowania pałeczek *Serratia* sp.

w warunkach tlenowych i beztlenowych [87]. *S. liquefaciens* może również być czynnikiem powodującym psucie się mleka [88].

Serratia sp. są bakteriami spotykanymi również w szpitalach, co zostało opisane w Rozdziale 2 dotyczącym chorobotwórczości pałeczek *Serratia* u ludzi. Kolonizują one sprzęty medyczne, takie jak: aparaty do mierzenia ciśnienia, koncentratory tlenu, zestawy do wlewów dożylnych, wenflony, fiolki z różnego rodzaju lekami oraz dozowniki do mydła i środków antybakteryjnych [89]. *S. liquefaciens* i *S. marcescens* są również izolowane z inkubatorów noworodkowych, respiratorów, laktatorów, laryngoskopów i endoskopów [90].

9. Metody izolacji i identyfikacji pałeczek z rodzaju *Serratia*

Metody izolacji bakterii na podłożach hodowlanych z rodzaju *Serratia* w głównej mierze zostały przedstawione przez Grimont i wsp. w 2006 roku [33]. Podłoża te zapewniają wstępną identyfikację bakterii na podstawie określonych cech biochemicznych.

Pierwszą grupą zaproponowanych podłóż były selektywne podłoża oparte na produkcji enzymu deoksyrybonukleazy oraz oporności na określone antybiotyki. Przykładem takiego podłoża jest DTC agar, które jest standardowym podłożem z błękitem toluidynowym wzbogaconym o antybiotyk cefalotynę. Podłoże to może być również modyfikowane poprzez dodatek L-arabinozy i czerwieni fenolowej przy obecności indykatora zieleni malachitowej oraz suplementację antybiotykami ampicyliny, amfoterycyny B, kolimycyny M oraz cefalotyny. Dodana do podłoża L-arabinoza i czerwień fenolowa spowodowały, że *S. marcescen*s tworzy kolonie otoczone czerwoną strefą halo. W przeciwieństwie do *S. marcescens* pozostałe pałeczki z rodzaju *Serratia* tworzyły kolonie bakteryjne otoczone żółtą strefą halo [33].

Podłożem różnicującym pozwalającym na wstępną identyfikację bakterii z rodzaju *Serratia* może być podłoże DNAse. Podłoże to umożliwia wstępne rozróżnienie bakterii na podstawie ich zdolności do rozkładu obecnego w podłożu DNA. Zmiany zachodzące w danym podłożu w zależności od zastosowanego indykatora (błękit toluidynowy, zieleń malachitowa, HCl) mogą wskazać na obecność pałeczek z rodzaju *Serratia*. W obecności błękitu toluidynowego obserwowana jest różowa strefa wokół linii posiewu, natomiast przy suplementacji podłoża zielenią malachitową i HCl obecność *Serratia* sp. powoduje odbarwienie podłoża [168].

Kolejna grupa podłóż to podłoża selektywne oparte na wykorzystywaniu różnych związków jako źródła węgla. Podłoże minimalne z dodatkiem mezo-erytrytolu jako źródło węgla zaprojektowane w 1972 roku, jest pierwszym przykładem takiego podłoża. Niedługo po jego opisaniu dokonano jego modyfikacji poprzez dodanie do podłoża irgasanu (5-chloro-2-(2,4-dichlorofenoksy)fenol). Irgasan jako związek przeciwgrzybiczy, bakteriobójczy i bakteriostatyczny miał za zadanie zwiększyć selektywność podłoża. Niestety zaproponowany dobór składników podłoża uniemożliwiał wzrost kilku gatunków z rodzaju *Serratia*, w tym

w m.in. kilku szczepów *S. marcescens* oraz gatunków *S. plymuthica* i *S. liquefaciens*. Najbardziej rekomendowanym podłożem selektywnym do izolacji pałeczek z rodzaju *Serratia* jest podłoże CT. Powstało ono przez modyfikację podłoża minimalnego M70 i zostało opracowane przez Starr et al. w 1976 roku [33]. Zapewnia ono selektywną izolację gatunków z rodzaju *Serratia* z prób o zakładanej dużej różnorodności gatunkowej, co spotykane jest przykładowo w próbkach kału, czy też w próbach środowiskowych. W podłożu CT źródłem węgla jest siarczan talu i kwas kaprylowy. Wzrost bakterii z rodzaju *Serratia* widoczny jest jako drobne bezbarwne, mleczno-białe lub lekko różowe kolonie [33]. Zaprezentowane na Ryc. 2 zdjęcie przedstawia wzrost bezbarwnych oraz mleczno-białych kolonii tworzonych przez *Serratia* sp. na podłożu selektywnym CT [91].

Rycina 2. Wzrost pałeczek *Serratia* sp. na podłożu selektywnym CT [91]

Oprócz wstępnej identyfikacji bakterii z rodzaju *Serratia* na podłożach hodowlach, do identyfikacji tych bakterii może posłużyć metoda MALDI TOF (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*). Identyfikacja mikroorganizmów opiera się na analizie białek rybosomalnych występujących w wysokich stężeniach w komórkach mikroorganizmów. Mieszaninę białek rybosomalnych uzyskuje się poprzez ich ekstrakcję z użyciem alkoholu etylowego, kwasu mrówkowego i acetonitrylu. Uzyskane ekstrakty białkowe nanoszone są na płytkę MALDI i wysuszone w temperaturze pokojowej z roztworem matrycy (HCCA). Po wprowadzeniu płytki do spektrometru masowego urządzenie laserowe napromieniowuje mieszaninę matrycy z analizowanym materiałem impulsem światła UV. Działanie to pozwala na uwolnieniu dodatnio naładowanych białek i peptydów. Przyspieszane w polu elektromagnetycznym jony trafiają do detektora z prędkością, która jest uzależniona od ich masy. W wyniku pomiaru czasu przelotu jonów tworzone jest widmo mas posiadające charakterystyczny dla identyfikowanego

szczepu wzorzec rozkładu mas i natężenia. Takie widmo traktowane jest jako „proteomiczny odcisk palca” i stanowi podstawę analizy. Oprogramowanie MALDI Biotyper analizuje uzyskane widmo badanej próbki przyrównując go do widm szczepów referencyjnych obecnych w bibliotece bazy danych. Podczas tej analizy generowany jest logarytm wyniku (log(score)) wyrażany w przedziale od 0,000 do 3,000. Im większa jest wartość uzyskanego logarytmu, tym większe jest podobieństwo uzyskanego widma, a widmami szczepów znajdujących się w bazie danych. Jeżeli wynik przyrównania wynosi od 3,000 do 2,000 oznacza to identyfikację do poziomu gatunku. Wynik wynoszący od 1,999 do 1,700 jest informacją o identyfikacji do poziomu rodzaju, natomiast wynik o wartości niższej niż 1,700 oznacza brak identyfikacji [92].

Metoda MALDI TOF jest bardzo obiecującą metodą identyfikacji różnego rodzaju mikroorganizmów. Ciągłe udoskonalenia prowadzą do rozszerzenia bazy danych o kolejne grupy szczepów referencyjnych usprawniając tym proces identyfikacji. Opracowane specjalne moduły umożliwiają identyfikację mikroorganizmów nawet bezpośrednio z krwi pacjenta. Metoda ta posiada wiele innych zalet potwierdzających jej użyteczność w identyfikacji mikroorganizmów. Jedną z najważniejszych zalet tej metody jest wiarygodność wyników identyfikacji uzyskanych w bardzo krótkim okresie czasu. Do samej analizy wykorzystywana jest również mała ilość próbki, co nie przeszkadza w ewentualnych dalszych analizach. Uzyskany wynik identyfikacji nie wymaga przeprowadzania dodatkowych testów takich jak test na katalazę czy oksydazę oraz barwienie Grama. Procedura przygotowania próbki do identyfikacji oraz obsługa spektrometru nie jest skomplikowana, jednakże wymaga odpowiedniego przeszkolenia. Identyfikacja proteomiczna MALDI TOF ma wysoką zgodność w identyfikacji mikroorganizmów z metodami biochemicznymi i genetycznymi [92].

MALDI TOF jak wszystkie stosowane metody ma swoje ograniczenia. Główną wadą tej metody jest wciąż zbyt mała baza danych widm szczepów referencyjnych, która w dużym stopniu ogranicza identyfikację niektórych bakterii wyizolowanych ze środowiska. Problemy mogą również wystąpić na etapie ekstrakcji białek rybosomalnych. Poprzez różnice w budowie ściany komórkowej wymagane są różne modyfikacje klasycznej metody z użyciem etanolu, kwasu mrówkowego i acetonitrylu. Do identyfikacji bakterii niezbędne jest posiadanie świeżych i czystych hodowli, co czasami jest problematyczne w przypadku długo rosnących rodzajów bakterii. Ograniczeniem metody jest również wymóg posiadania świeżego roztworu matrycy, co jest uciążliwe w przypadku identyfikacji dużej liczny prób. Do wad metody MALDI TOF zaliczyć można m. in. brak możliwości rozróżnienia *Escherichia coli* i rodzaju *Shigella* oraz identyfikację *Salmonella* tylko do poziomu rodzaju [92,93].

W identyfikacji mikroorganizmów oprócz metod biochemicznych oraz metod proteomicznych popularne są metody genetyczne, gdzie „złotym standardem” jest sekwencjonowanie genu 16S rRNA. Gen 16S rRNA jest zaliczany do grupy genów konserwatywnych pod względem ewolucyjnym. Uzyskanie za pomocą reakcji PCR całej lub fragmentu sekwencji genu 16S rRNA pozwala na przeprowadzenie

identyfikacji badanego szczepu. Uzyskana sekwencja jest przyrównywana do sekwencji znajdujących się w bazie danych. Najbardziej popularną bazą danych jest baza BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), która zawiera sekwencje dla 21615 gatunków bakterii (dane na czerwiec 2022 roku) [94]. W bazie danych BLAST znajduje się 68 sekwencji genu 16S rRNA dla różnych gatunków z rodzaju *Serratia*. Identyfikacja bakterii z użyciem genu 16S rRNA w bazie BLAST opiera się na kilku parametrach. Pierwszy dotyczy dokładności dopasowania i oznacza, że porównywane sekwencje powinny mieć najmniejszą liczbę tzw. „mismatches". Parametrem branym pod uwagę jest również długość dopasowania, czyli badane sekwencje powinny obejmować całą sekwencję genu oraz zgodność dopasowania oznaczająca dokładne dopasowaną sekwencję do sekwencji referencyjnej. Ostatni parametr dotyczy zróżnicowania dopasowania, czyli przedstawienia innych gatunków najbardziej pasujących do analizowanej sekwencji. Zdarza się, że sekwencjonowanie genu 16S rRNA nie jest wystarczające do identyfikacji bakterii z powodu wysokiego podobieństwa genetycznego w obrębie grupy mikroorganizmów lub też braku sekwencji referencyjnej w bazie danych [95].

10. Cele pracy doktorskiej

Głównym celem rozpoczęcia prac dotyczących charakterystyki wirulencji odzwierzęcych pałeczek *Serratia* sp. jest brak informacji w literaturze o takiego typu badaniach w odniesieniu do testowanych w tej pracy izolatów. Pomimo opisywanego w literaturze występowania pałeczek z rodzaju *Serratia* u zwierząt, brakuje informacji o występowaniu gatunku *S. liquefaciens* u dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów i świń domowych. Natomiast w przypadku gatunku *S. marcescens* nie opisano jego izolacji od krów domowych i świń domowych. W literaturze nie znaleziono również informacji o występowaniu enzymu deoksyrybonukleazy, żelatynazy i lipazy u *S. marcescens* i *S. liquefaciens* izolowanych od zwierząt. Jak dotąd nie zostały również opisane prace pokazujące detekcję wybranych genów wirulencji u odzwierzęcych *S. marcescens* i *S. liquefaciens* oraz charakterystyki długości ich łańcucha LPS. Nie znaleziono również badań pokazujących stopnia wrażliwości na bakteriobójcze działanie ludzkiej surowicy, izolowanych od zwierząt pałeczek *S. marcescens* i *S. liquefaciens*.

W nawiązaniu do posiadanej wiedzy na temat pałeczek z rodzaju *Serratia* w pracy doktorskiej wyznaczono następujące cele:

- Opracowanie metodologii izolacji materiału odzwierzęcego w kierunku pałeczek *Serratia* sp.
- Określenie częstości występowania *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w izolatach pozyskanych od dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów domowych i świń domowych.
- Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez detekcję enzymów zewnątrzkomórkowych.
- Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez detekcję wybranych genów wirulencji.
- Określenie długości O-swoistego łańcucha LPS dla *S. liquefaciens* i *S. marcescens* pozyskanych od zwierząt gospodarskich i wolno żyjących.
- Określenie stopnia przeżywalności izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w ludzkiej surowicy NHS.

Efektem pracy doktroskiej jest także unikatowa kolekcja odzwierzęcych pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens*, które mogą być wykorzystywane do dalszych badań.

11. Materiały

11.1. Materiał badań

Materiał do badań stanowiły wymazy mikrobiologiczne pobierane z tusz zwierząt rzeźnych przez lekarzy weterynarii. Wymazy pobierano z tusz zwierząt w trakcie rutynowego badania lekarsko-weterynaryjnego. Zwierzęta, od których pobierane były wymazy nie podlegały ochronie z tytułu ochrony gatunkowej zwierząt.

Pierwszą grupą badanego materiału były wymazy mikrobiologiczne pozyskane z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) i saren europejskich (*Capreolus capreolus*) z rzeźni znajdującej się na terenie województwa wielkopolskiego. Wymazy pobierano po procesie wychładzania tusz. Wymazy te zostały udostępnione w latach 2017/2018 do realizacji pracy magisterskiej Doktorantki przez dr Katarzynę Morkę we współpracy z prof. dr hab. Jarosławem Bystroniem z Zakładu Mikrobiologii Żywności i Higieny Przetwórstwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Z ówcześnie przebadanych 605 dzików euroazjatyckich i 93 saren europejskich uzyskano łącznie 144 izolaty, z czego 139 izolatów należało do gatunku *S. liquefaciens*, a 5 izolatów należało do gatunku *S. marcescens* (Tab. 4). Uzyskane wówczas izolaty z rodzaju *Serratia* są charakteryzowane obecnie w pracy doktorskiej. W tym zakresie praca doktorska stanowi kontynuację badań rozpoczętych w ramach pracy magisterskiej Doktorantki pt.: „Analiza zależności pomiędzy bioróżnorodnością mikroflory zwierząt a bakteriami izolowanymi ze środowiska ich bytowania".

Drugą grupę badanego materiału stanowiły wymazy mikrobiologiczne pozyskane z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych (*Bos taurus taurus*) z rzeźni położonej na terenie województwa śląskiego. Wymazy pobierano po procesie wykrwawienia zwierząt, a przed procesem ich patroszenia. Wymazy otrzymywane były w okresie od marca do października 2020 roku. W okresie tym przebadano łącznie 55 tusz krów domowych (*Bos taurus tautus*) (Tab. 4).

Trzecią grupą badanego materiału stanowiły wymazy mikrobiologiczne pozyskane z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy świń domowych (*Sus scrofa domestica*). Wymazy od tych zwierząt pobierano przed procesem patroszenia w dwóch odrębnych rzeźniach. Pozyskane wymazy różniły się również miejscem ich pobrania. Z rzeźni zlokalizowanej na terenie województwa opolskiego pozyskiwano wymazy zarówno z jamy nosowo-gardłowej jak i odbytnicy świń domowych (*Sus scrofa domestica*). W okresie od sierpnia 2020 roku do października 2020 roku przebadano 24 osobniki. Z kolei z rzeźni znajdującej się w województwie wielkopolskim pobierano wymazy wyłącznie z jamy nosowo-gardłowej świń domowych (*Sus scrofa domestica*). Od listopada 2020 roku do stycznia 2021 roku przebadano 35 osobników (Tab. 4).

Materiał pozyskany z tusz krów domowych i świń domowych włączono do pracy doktorskiej dzięki współpracy z prof. dr hab. Jarosławem Bystroniem (Zakład

Mikrobiologii Żywności i Higieny Przetwórstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu).

Tabela 4. Wykaz liczby przebadanych tusz zwierząt wolno żyjących i zwierząt hodowlanych

Miejsce poboru wymazów/ rok	**Liczba badanych zwierząt wolno żyjących**		**Liczba badanych zwierząt hodowlanych**	
	Dzik euroazjatycki (*Sus scrofa*)	Sarna europejska (*Capreolus capreolus*)	Krowa domowa (*Bos taurus taurus*)	Świnia domowa (*Sus scrofa domestica*)
Województwo wielkopolskie 2017/2018	605	93	x	x
Województwo śląskie 2020	x	x	55	x
Województwo opolskie 2020	x	x	x	24
Województwo wielkopolskie 2020/2021	x	x	x	35
	Σ=605	Σ=93	Σ=55	Σ=59

Materiałami do badań były również szczepy kontrolne do prowadzonych eksperymentów, które pozyskano z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Szczepów *S. marcescens* PCM 501 oraz PCM 549 i szczepu *S. liquefaciens* PCM 2830 użyto do badania występowania określonych genów wirulencji.

Doktorantka w 2019 roku ukończyła szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie zgodnie z art. 21 Ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych.

11.2. Podłoża, odczynniki, sprzęt

Tabela 5. Wykaz podłóż wykorzystywanych w realizacji zadań badawczych

Nazwa podłoża	Skład
Nutrient LAB-AGAR (Biomaxima)	agar (15g/l), ekstrakt mięsny (1g/l), pepton (5g/l), chlorek sodu (5g/l), ekstrakt drożdżowy (2g/l) pH końcowe: 7.1±0.2 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
DNase Test LAB-AGAR z dodatkiem błękitu toluidynowego (Biomaxima)	tryptoza (20g/l), kwas deoksyrybonukleinowy DNA (2g/l), chlorek sodu (5g/l), agar (15g/l), błękit toluidynowy (0,10g/l) pH końcowe: 7.1 – 7.5 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
Nutrient Broth (Biomaxima)	D(+)glukoza (1g/l), pepton (15g/l), chlorek sodu (6g/l), ekstrakt drożdżowy (3g/l) pH końcowe: 7.4±0.2 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
Nutrient LAB-AGAR z dodatkiem żelatyny (Biomaxima)	agar (15g/l), ekstrakt mięsny (10g/l), pepton mięsny (10g/l), chlorek sodu (5g/l), żelatyna (8g/l) pH końcowe: 7.1±0.2 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
Podłoże do badania aktywności enzymu lipazy	agar (20g/l; Biocorp), chlorek sodu (5g/l; Chempur), baktopepton (10g/l; Difco), chlorek wapnia (0,4g/l; Chempur), 10% Tween 80 (100ml; Biocorp) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
CT Agar (wg Grimont i wsp. [33])	Roztwór śladowych składników: H_3PO_4 (1,17ml/1l; Chempur), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0556g/1l; Chempur), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0287g/l; Chempur), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,0223g/l; Chempur), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,025g/l; Chempur), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,003g/l; Chempur), H_3BO_3 (0,0062g/l; Chempur) Roztwór A: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,0147g/500ml; Chempur), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.123g/500ml; Chempur), KH_2PO_4 (0,680g/500ml; Chempur), K_2HPO_4 (2,610g/500ml; Chempur), trace element solution 10ml/500ml, caprylic acid (1,1ml/500ml; Sigma-aldrich), ekstrakt drożdżowy 5% (2ml/500ml; Biocorp), thallous sulfate (025g/500ml; Sigma-aldrich) Roztwór B: chlorek sodu (7g/500ml, Chempur), $(NH_4)_2SO_4$ (1g/500ml; Chempurs), agar (15g/500ml) pH końcowe: 7.2 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.
Columbia AGAR (Oxoid)	agar (15g/l), chlorek sodu (5g/l), skrobia (1g/l), pepton (23g/l), 5% odwłókniona krew barania (Biomaxima) pH końcowe: 7.3±0.2 (25°C) Sterylizacja przez autoklawowanie 121°C przez 15 minut.

Tabela 6. Wykaz sprzętu używanego do realizacji zadań badawczych

Nazwa sprzętu	Firma
MALDI TOF/TOF ultrafleXtreme	Bruker
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Heraeus FRESCO 21 Centrifuge	ThemoFisher Scientific
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad
DS-11+ Spectrophotometer	DeNovix
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Vortex V-1 plus	bioSan
Digital Dry Bath	Labnet
Kołyska laboratoryjna KL-942	JW ELECTRONIC
System do obrazowania żeli PXi 6	Syngene
Mieszadło magnetyczne	Wigo
Mikrofalówka	Menuett
Komora laminarna klasy II	CELLGARD ES
Vortex IR	STARLAB
ESPRESSO Centrifuge	ThermoFisher Scientific
Cieplarka Froilabo	BIOExpert
Mini PROTEAN 3 System Glass Plates, Spacer Plates	Bio-Rad
Mini PTOTEAN 3 System Glass Plates Short Plates	Bio-Rad

Tabela 7. Wykaz odczynników używanych do realizacji zadań badawczych

Nazwa odczynnika	Firma
Yersinia CIN Selective Supplement	Biomaxima
Genomic Mini	A&A Biotechnology
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific
dNTP Mix 10	A&A Biotechnology
DNA Marker 3	A&A Biotechnology
GeneRuller	ThermoFisher Scientific
Bufor obciążający do eletroforezy agarozowej	A&A Biotechnology
Startery do genów wirulencji	Sigma-Aldrich
Agaroza	EURX
Midori Green Advance DNA Stain	Genetics
Kwas borowy H_3BO_4 cz.d.a.	P.P.H. POCh Gliwice
Sodu wodorotlenek mikrogranulki cz.d.a.	POCH
Alkohol metylowy cz.d.a. CH_3OH – 32,04 g/mol	Chempur
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	Sigma-Aldrich
Trifluoroacetic acid	Honeywell, Fluka
Kwas octowy min. 99,5% cz.d.a. $C_2H_4O_2$ – 60 g/mol	Chempur
Acetonitryle 99,9%	Honeywell, Riedel-de Haën
Formic acid 96%	Honeywell, Fluka
Etylowy alkohol bezwodny 99,8% cz.d.a.	POCH
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid-Na2-salt)	SERVA
Glycine $C_2H_5NO_2$	SERVA

Dodecylsulfate-Na-salt $C_{12}H_{25}O_4S$-Na	SERVA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane $C_4H_{11}NO_3$	SERVA
Kwas cytrynowy 1 hydrat cz.d.a. $C_6H_8O_7xH_2O$	Chempur
Azotan srebra cz.d.a. $AgNO_3$	P.P.H. POCh Gliwice
Periodic acid 99%	Sigma-Aldrich
Formaldehyd 36-38% cz.d.a.	POCH
Amoniak 25% cz.d.a. (woda amoniakalna) NH_4OH	Chempur
Proteinaza K (20 mg/ml	A&A Biotechnology
Ammonium persulfate (AP)	Sigma-Aldrich
Woda do LC-MS	Sigma-Aldrich
Normal Human Serum	Sigma-Aldrich

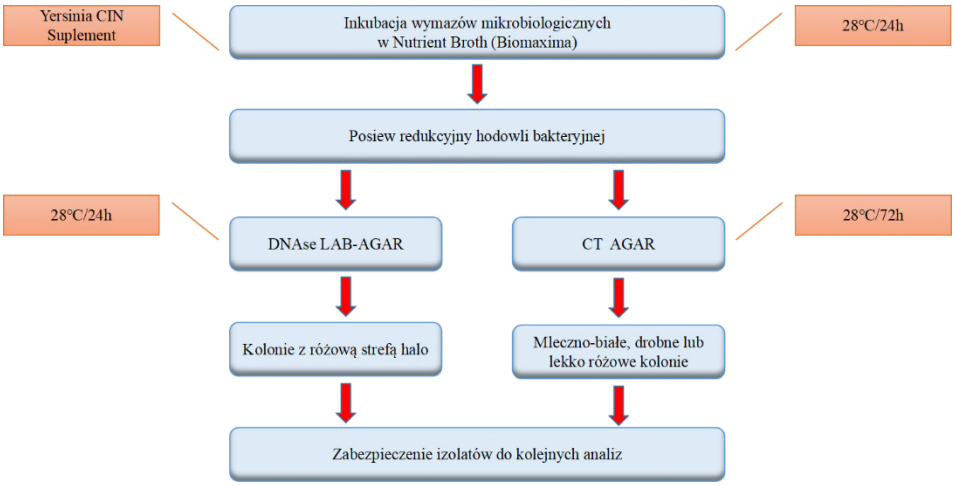
12. Metody

12.1. Izolacja materiału mikrobiologicznego

Materiał mikrobiologiczny został pozyskany z wymazów jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy. Wymazy pobierane były z wykorzystaniem jałowych wymazówek z podłożem transportowym Amies, a następnie transportowane w warunkach chłodniczych do Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

W kolejnym etapie izolacji wymazówki zostały wprowadzone do podłoża płynnego Nutrient Broth (Biomaxima) w celu namnożenia znajdującego się na nich materiału. Ukierunkowując izolację na uzyskanie bakterii Gram-ujemnych dodano do podłoża Nutrient Broth - *Yersinia* CIN Selective Suplement (Biomaxima), który w swoim składzie zawiera dodatek antybiotyków: cefsulodyny (7,5 mg), irgasanu (2 mg) oraz nowobiocyny (1,25 mg). Aby uzyskać selektywność podłoża Nutrient Broth, do probówki zawierającej 5 ml podłoża płynnego dodano 50 µl roztworu suplementu przygotowanego poprzez dodanie 2,5 ml jałowej wody destylowanej i 70% etanolu do fiolki z antybiotykami. Następnie przygotowane probówki z wprowadzonymi wymazówkami inkubowane były w temperaturze 28°C przez 24 godziny. Po okresie inkubacji hodowle bakteryjne równolegle wysiano redukcyjnie na podłoże DNAse LAB-AGAR oraz CT LAB-AGAR. Hodowle na tych podłożach prowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 3. Materiał wysiany na podłoże DNAse LAB-AGAR inkubowany był w 28°C przez 24 godziny, natomiast materiał wysiany na podłoże CT LAB-AGAR inkubowany był w temperaturze 28°C przez czas 72 godziny lub więcej w zależności od dynamiki wzrostu pozyskanych izolatów. W następnej kolejności po okresie inkubacji materiału na podłożach stałych, przeprowadzona została wstępna charakterystyka uzyskanych makromorfologii izolatów bakteryjnych. Wstępna identyfikacja izolatów na podłożu DNAse LAB-AGAR opierała się na wyborze kolonii bakterii, wokół których pojawiła się różowa strefa halo. Zakładano, że te izolaty należą do rodzaju *Serratia*. Ze względu na słabą rozróżnialność izolatów na podłożu CT LAB-AGAR, do dalszych badań wybierane były wszystkie kolonie bakteryjne. Po etapie wstępnej identyfikacji zabezpieczono wybrane kolonie bakteryjne do dalszych analiz dzięki technice przechowywania bakterii w temperaturze -80°C.

Rycina 3. Schemat izolacji materiału mikrobiologicznego pochodzącego z wymazów



Zaprezentowana na Ryc. 3 metodyka izolacji została samodzielnie opracowana w oparciu o dostępną wiedzę na temat podłóż stosowanych do izolacji *Serratia* podaną przez Grimont i wsp. [33].

Modyfikacja własna metody izolacji *Serratia*:

- Suplementacja podłoża Nutrient Broth antybiotykami: cefsulodyn, irgasan, nowobiocyna
  - **CEL:** zwiększenie selektywności podłoża poprzez zahamowanie wzrostu bakterii takich jak m.in: *E. coli* i *Salmonella* sp.
- Prowadzenie izolacji równocześnie na podłożu równicujących (DNAse LAB AGAR) oraz na podłożu selektywnym (CT AGAR)
  - **CEL:** zwiększenie prawdopodobieństwa izolacji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens.*

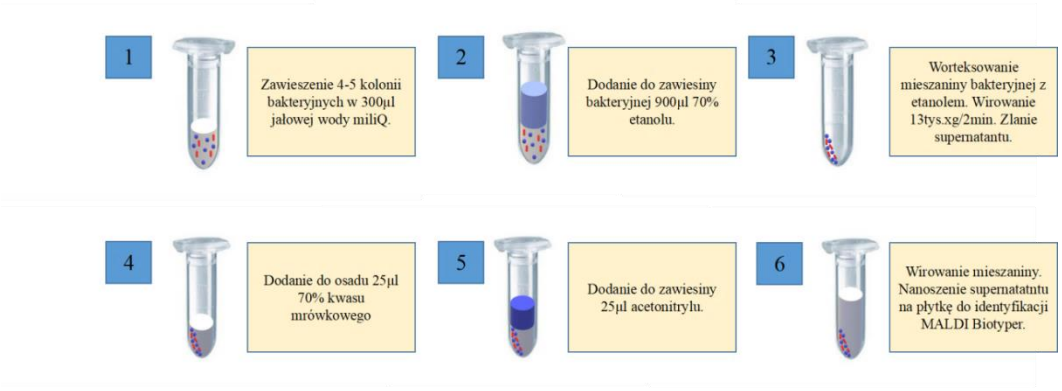
12.2. Proteomiczna identyfikacja materiału mikrobiologicznego

Proteomiczna identyfikacja Gram-ujemnych izolatów bakteryjnych została przeprowadzona z zastosowaniem spektrometru masowego MALDI-TOF ultrafleXtreme (Bruker Daltonics GmbH) w IITD PAN. Izolaty bakteryjne identyfikowane były na podstawie porównania uzyskanych widm masowych mieszaniny bakteryjnych białek rybosomalnych z widmami szczepów referencyjnych obecnych w bazie MALDI Biotyper. Do uzyskania mieszaniny białek

zastosowano metodę ekstrakcji z użyciem kwasu mrówkowego i acetonitrylu (Ryc. 4) z pominięciem mniej dokładnej metody bezpośredniego naniesienia próbki bakterii na płytkę do identyfikacji.

Ekstrakcję mieszaniny białek przeprowadzono zgodnie z procedurą firmy Bruker. Zgodnie z tą procedurą w pierwszym etapie pojedyncze kolonie bakteryjne zawieszono w 300 µl czystej wody do HPLC (Sigma-Aldrich) wprowadzonej do probówki typu Eppendorf. W następnej kolejności do uzyskanej zawiesiny bakteryjnej dodano 900 µl 70% roztworu etanolu (POCH) i wymieszano zawiesinę z użyciem worteksa typu Vortex IR firmy StarLab. W kolejnym kroku uzyskaną mieszaninę odwirowano w wirówce typu ESPRESSO firmy ThermoFisher Scientific przez 2 minuty przy 13 tys. RPM (ang. *revolutions per minute*). Po odwirowaniu powstały supernatant usunięto za pomocą pipety, a następnie pozostawiony osad suszono w temperaturze pokojowej przez około 5 minut. Do wysuszonego osadu dodano 25 µl roztworu 70% kwasu mrówkowego (Honeywell, Fluka) oraz 25 µl 100% acetonitrylu (Honeywell, Riedel-de Haen) i całość wymieszano pipetą poprzez kilkukrotne wpuszczanie i wypuszczanie. Roztwór ten umożliwia ekstrakcję białek rybosomalnych z komórek mikroorganizmów. W końcowym etapie mieszaninę odwirowano przez 2 minuty przy 13 tys. RPM i uzyskany supernatant nanoszono w objętości 1 µl na stalową płytkę do identyfikacji MALDI. Płytkę z naniesionymi próbami pozostawiono w temperaturze pokojowej do momentu wyschnięcia. Następnie na próby naniesiono 1 µl roztworu matrycy (HCCA – α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich). Po krystalizacji i wyschnięciu próbki oraz matrycy materiał był gotowy do analizy.

Rycina 4. Ekstrakcja mieszaniny białek z użyciem kwasu mrówkowego i acetonitrylu [92].



Płytkę MALDI z naniesionymi próbami oraz matrycą umieszczono w spektrometrze mas. Następnie z użyciem programu komputerowego flexControl wygenerowano widma mieszaniny białek, które były w kolejnym kroku analizowane w bazie widm referencyjnych MALDI Biotyper 3.1 zawierającej 6904 widm szczepów referencyjnych. W oparciu o klasyfikację opracowaną przez Bruker Daltonik MALDI Biotyper uzyskane widma były przyporządkowane do odpowiednich kryteriów oznaczających wartość przyrównania widm.

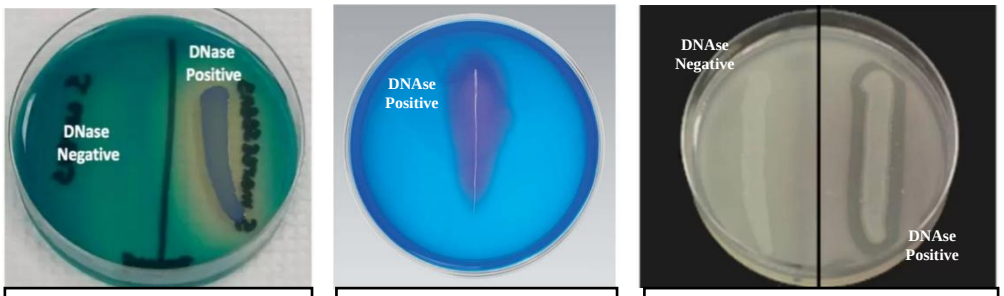
- **2.300 – 3.000** → pewna identyfikacja do poziomu gatunku
- **2.000 – 2.299** → prawdopodobna identyfikacja do poziomu gatunku
- **1.700 – 1.999** → prawdopodobna identyfikacja do poziomu rodzaju
- **0.000 – 1.699** → brak identyfikacji

12.3. Detekcja enzymu deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy

Badanie występowania enzymów zewnątrzkomórkowych u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* przeprowadzono na podłożach różnicujących DNAse LAB-AGAR, Lipase LAB-AGAR oraz Gelatinase LAB-AGAR (Tab. 8).

Detekcja enzymu zewnątrzkomórkowego deoksyrybonukleazy testowana była na podłożu DNAse LAB-AGAR. Podłoże, które w swoim składzie zawiera czynnik różnicujący - DNA oraz trzy rodzaje składników będących indykatorami zachodzących zmian podłoża wywołanych przez testowane bakterie (Ryc. 5). Pierwszym rodzajem stosowanego indykatora jest błękit toluidynowy. Zastosowanie tego indykatora powoduje zabarwienie się podłoża na kolor niebieski. Testowane bakterie posiewane były rysą, a okres inkubacji w temperaturze 37°C trwał 24 godziny. W wyniku właściwości metachromatycznych błękitu toluidynowego rozkład zawartego w podłożu DNA widoczne jest jako zmiana zabarwienia podłoża na kolor różowy wokół kolonii bakteryjnych. Jako indykator zachodzących zmian na podłożu DNAse LAB-AGAR może być zastosowana również zieleń malachitowa. Podłoże o zabarwieniu zielonym przy aktywnym enzymie odbarwia się wokół kolonii bakteryjnych. Indykatorem używanym w tym badaniu jest również kwas solny (HCl). W odróżnieniu od poprzednich, ten indykator dodaje się do podłoża po okresie inkubacji zalewając nim płytkę agarową. Rozkład obecnego w podłożu DNA widoczny jest jako strefa przejaśnienia podłoża w okolicach kolonii bakteryjnych.

Rycina 5. Indykatory stosowane w podłożu DNAse LAB AGAR [96,97]



Podłoże DNAse z dodatkiem zieleni malachitowej | Podłoże DNAse z dodatkiem błękitu toluidynowego | Podłoże DNAse z dodatkiem HCl

Badanie obecności enzymu żelatynazy przeprowadzone zostało na podłożu Nutrient LAB-AGAR z dodatkiem odpowiedniej ilości żelatyny. Testowane izolaty

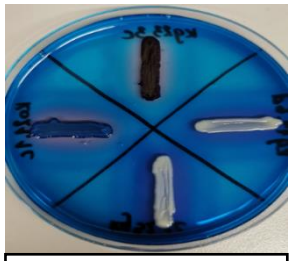
bakteryjne zostały posiane posiewem punktowym i inkubowane w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po okresie inkubacji podłoże schłodzono w temperaturze 4°C przez czas około 1 do 2 godzin. Ten krok wykonano celem zaobserwowania stref przejaśnienia podłoża wokół posiewów punktowych izolatów produkujących badany enzym.

Lipaza jest kolejnym enzymem zewnątrzkomórkowym badanym w pracy doktorskiej. Badanie przeprowadzone było na specjalnie skomponowanym podłożu zawierającym m. in. chlorek sodu, baktetopepton, chlorek wapnia oraz 10% roztwór Tween 80, pełniącego funkcję źródła tłuszczów. Testowane izolaty *S. liquefaciens* i *S. marcescens* posiane były posiewem punktowym i inkubowane w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Aktywność enzymu lipazy widoczna jest przez powstanie strefy zmętnienia wokół posianej masy bakteryjnej. Reakcja ta jest wynikiem oddziaływania rozłożonych kwasów tłuszczowych z jonami wapnia obecnymi w podłożu.

Tabela 8. Metodologia badań występowania enzymów zewnątrzkomórkowych

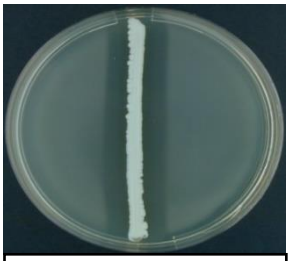
Cecha diagnostyczna	**DNAse LAB-AGAR**	**Lipase LAB-AGAR**	**Gelatinase LAB-AGAR**
Metoda posiewu	posiew rysą	posiew punktowy	posiew punktowy
Warunki inkubacji	37°C/24h	37°C/24h	37°C/24h
Specjalne postępowanie	–	–	schłodzenie podłoża w temperaturze 4°C
Interpretacja wyników:			
Wynik dodatni	różowa strefa wokół lini posiewu	zmętnienie podłoża wokół lini posiewu	przejaśnienie podłoża wokół lini posiewu
Wynik ujemny	brak zmian wokół linii posiewu	brak zmian wokół linii posiewu	brak zmian wokół linii posiewu

Rycina 6. Podłoża różnicujące używane do sprawdzania obecności żelatynazy [98], lipazy i deoksyrybonukleazy



Aktywny enzym deoksyrybonukleaza na podłożu DNAse LAB-AGAR

Aktywny enzym lipaza na podłożu Lipase LAB-AGAR



Aktywny enzym żelatynaza na podłożu Gelatinase LAB-AGAR

12.4. Detekcja enzymu hemolizyny [99]

Aktywność hemolityczna izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* badana była przy zastosowaniu podłoża Columbia AGAR z dodatkiem 5% krwi baraniej firmy bioMérieux. Podłoże to w swoim składzie zawierało m.in. ekstrakt wołowy i drożdżowy, skrobię kukurydzianą, chlorek sodu oraz odwłóknioną krew baranią. Testowane bakterie wysiewane były na dane podłoże metodą posiewu redukcyjnego i inkubowane w temperaturze 28°C przez 24 godziny. Rozkład obecnej w podłożu krwi widoczny jest jako strefa przejaśnienia podłoża wokół kolonii bakteryjnej.

12.5. Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Izolacja genomowego DNA izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* została przeprowadzona z użyciem uniwersalnego zestawu do izolacji DNA Genomic Mini firmy A&A Biotechnology. Izolację rozpoczęto od założenia hodowli płynnej w podłożu Nutrient Broth (Biomaxima) w 28°C przez 24 godziny. W następnym kroku izolacji 1,5 ml hodowli przeniesiono do jałowych probówek typu Eppendorf i wirowano w wirówce Espresso Centrifuge (ThermoFisher Scientific) o prędkości 13 tys. RPM przez 5 minut. Po wirowaniu odlano supernatant, a osad zawieszono w 100 µl buforu Tris przez kilkukrotne pipetowanie. Następnie do zawiesiny dodano 200 µl roztworu lizującego i 20 µl roztworu proteinazy K. W kolejnym kroku uzyskaną mieszaninę worteksowano do momentu wymieszania dodanych składników i całość inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C w termobloku firmy Labnet. Po upływie 20 minut termoblok ustawiono na temperaturę 70°C i kontynuowano inkubację w tej temperaturze przez 5 minut. Po zakończonej inkubacji probówki worteksowano przez 20 sekund, a następnie wirowano 1 minutę przy prędkości 13 tys. RPM w wirówce marki Heraeus FRESCO 21 (ThermoFisher Scientific). Po wirowaniu uzyskany supernatant w zależności od ilości materiału przenoszono w objętości około 300 µl na minikolumny i całość ponownie wirowano przez 1 minutę przy prędkości 13 tys. RPM. W następnym etapie do minikolumn dodano 500 µl roztworu płuczącego i powtórzono wirowanie w parametrach podanych powyżej. Następnie minikolumny przełożono do 2 ml probówek i dodano 400 µl roztworu płuczącego. Minikolumny wirowano przez 2 minuty przy prędkości 13 tys. RPM. Po wirowaniu minikolumny ponownie przełożono do kolejnych probówek o pojemności 2 ml, a do wnętrza minikolumn dodano uprzednio ogrzanego do 70°C buforu Tris i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie probówki wirowano przez 1 minutę przy 13 tys. RPM. W ostatnim etapie izolacji DNA, po wirowaniu usunięto kolumny, a znajdujące się w roztworze DNA przechowywano do dalszych analiz w temperaturze 4°C lub temperaturze -20°C [100]

Wyizolowane genomowe DNA każdego izolatu *S. liquefaciens* i *S. marcescens* było analizowane w kierunku obecności sekwencji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. W pracy badano obecność genu *fimA* kodującego fimbrie typu I, genów *phlA* i *phlB* kodujących białka fosfolipazy A oraz geny *shlA* i *shlB* kodujące

białka ShlA i ShlB toksyny hemolitycznej *Serratia* sp. Detekcję obecności wymienionych genów przeprowadzono z wykorzystaniem techniki PCR z zaprojektowanymi starterami przedstawionymi w Tab. 9.

Tabela 9. Sekwencje zaprojektowanych starterów do badania obecności wybranych genów wirulencji

Liczba	Nazwa i sekwencja startera	Temperatura przyłączania starterów
1	START_shlB_S.liq 5'− GTGTTTCATTGGAGCAGCAG − 3' STOP_shlB_S.liq 5'− TCCCAGGACAGTCTGATCTG − 3'	63,6°C
2	START_shlA_S.liq 5'− GGTGTTTCAACTGCCGGTAACG − 3' STOP_shlA_S.liq 5'− TTATTTACCCGAAAAGACCCCCG − 3'	70,0°C
3	START_phlB_S.liq 5'− CGCCTATGGCAGACGTTAAT − 3' STOP_phlB_S.liq 5'− TTACTGCTGTCCGTATTGCG − 3'	62,8°C
4	START_phlA_S.liq 5'− GCATTTCTAATACAGAACTCATCCG − 3' STOP_phlA_S.liq 5'− GATGCCGAAACCGAGCAG − 3'	69,0°C
5	START_phlB_S.marc 5'− GGCTAAGGAGCAACAGATGG − 3' STOP_phlB_S.marc 5'− CCTGCAGCCATTTATCCAGT − 3'	70,0°C
6	START_phlA_S.marc 5'− ACCTCTGCAGTATCCCCGGT − 3' STOP_phlA_S.marc 5'− GGCTTTTGTTCCGCCATCG – 3'	60,7°C
7	START_shlB_S.marc 5'− AAAAATCACCGCCTTGAC – 3' STOP_shlB_S.marc 5'− CAGTACCTGAACCGGATCC – 3'	63,0°C
8	START_fimA_S.marc 5'− AGTATTATTGCCTTTGGCCG – 3' STOP_fimA_S.marc 5'− GTATTCGATGGTGAAGGTAGC – 3'	58,8°C
9	START_shlA_S.marc 5'− TGGATGAAAAATAATAACTTCAGACTTTCG − 3' STOP_shlA_S.marc 5'− ATGAATTCCGCGTTATTTGCCGCTGAAC − 3'	76,0°C
10	START_fim_S.liq 5'− AACAGCGATCATTTCCAGTTTGTGTG − 3' STOP_fim_S.liq 5'− ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC − 3'	61,1°C

Do reakcji została użyta polimeraza Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase firmy ThermoFisher Scientific w zestawie z pozostałymi odczynnikami. Mieszanina reakcyjna do badania obecności testowanych genów została sporządzona zgodnie z przedstawioną Tab. 10.

Przed przeprowadzeniem reakcji PCR każdorazowo wykonywano pomiar stężenia i czystości wyizolowanego genomowego DNA. Proces ten przeprowadzano z użyciem spektrofotometru DeNovix DS-11+. Do pomiaru stężenia DNA stosowano objętość 1 µl próby. Jako próby ślepej przed rozpoczęciem pomiaru używano buforu Tris z zestawu do izolacji DNA bakterii Gram-ujemnych firmy A&A Biotechnology. Czystość pozyskanego DNA określana była stosunkiem A260/A280 w granicach wartości 1,8 - 2,0. Do reakcji PCR używano DNA w stężeniu około 50 ng/µl.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej [101]

Składnik	**Objętość**
dH_2O	12,3 µl
5X Phusion HF Buffer	4 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl
Primer START (10µM)	1 µl
Primer STOP (10µM)	1 µl
DMSO	0,6 µl
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2U/µl)	0,2 µl
Matrycowe DNA	0,5 µl
Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej	**20 µl**

Reakcja PCR została przeprowadzona z wykorzystaniem termocyklera T100 firmy Bio-Rad. Warunki reakcji zostały dostosowane do wymagań producenta polimerazy typu Phusion i zostały przedstawione w Tab. 11.

Tabela 11. Warunki reakcji PCR [101]

Etap cyklu	**Temperatura**	**Czas**	**Liczba cykli**
Wstępna denaturacja	99°C	3 min	1
Denaturacja	98°C	10s	35
Przyłączanie starterów	58.8 - 76°C	30s	
Wydłużanie	72°C	45s	
Końcowe wydłużanie	72°C	5 min	1
Przechowywanie prób	12°C	∞	1

Jako kontrole pozytywne reakcji stosowano szczepy z zasobów Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Szczep *S. marcescens* PCM 501 stosowany był jako kontrola pozytywna obecności genów *fimA, phlA, phlB* oraz *shlA*. Natomiast szczep *S. marcescens* PCM 549 był kontrolą pozytywną dla obecności genu *shlB*. Dla izolatów należących do gatunku *S. liquefaciens* kontrolą pozytywną dla genów wirulencji *fimA, phlA, phlB* i *shlA* był szczep *S. liquefaciens* PCM 2830. Dla genu *shlB* nie udało się pozyskać kontroli pozytywnej z powodu braku dostępności szczepu posiadającego ten gen w bazach danych. Wynik reakcji PCR interpretowano na podstawie wielkości badanego produktu reakcji.

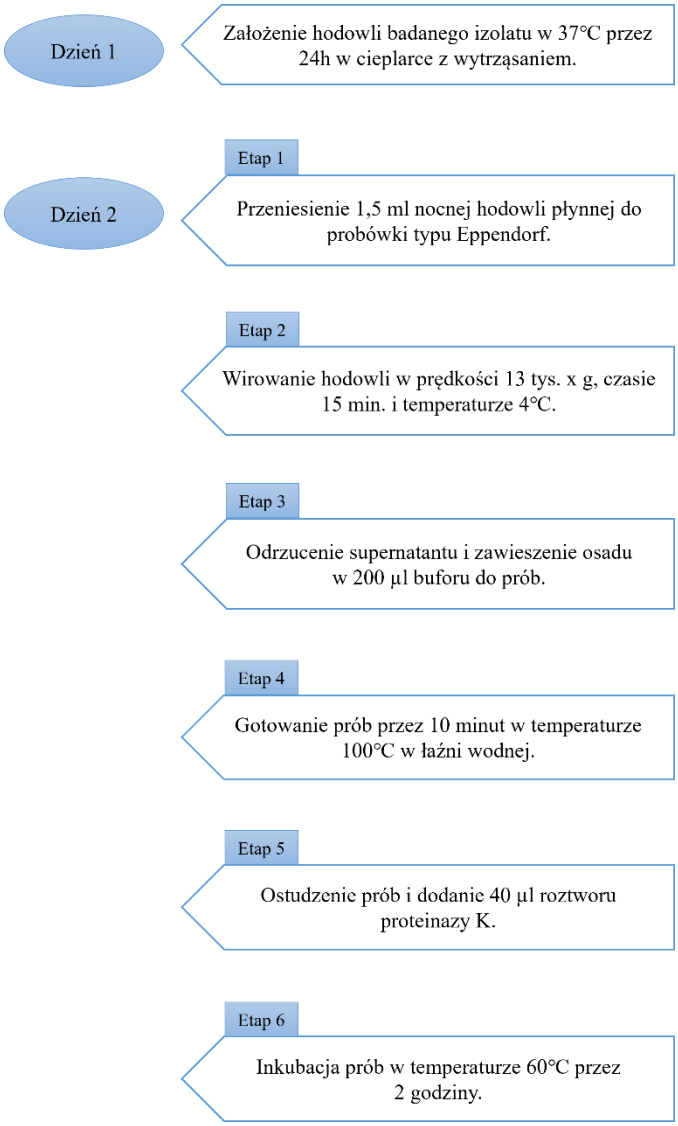
Szczepy pozyskane do badania z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów wypracowano jako kontrole pozytywne poprzez zastosowanie techniki PCR w gradiencie temperatur. Krok ten zastosowano również celem uzyskania najlepszego obrazu namnożonego produktu podczas reakcji PCR.

Wizualizację produktu uzyskanego z reakcji PCR przeprowadzono z wykorzystaniem elektroforezy agarozowej o stężeniu agarozy 0,8% (EURX). Elektroforezę przeprowadzono z użyciem aparatu Mini-Sub cell GT firmy Bio-Rad o dwóch rozmiarach żelu. Mniejsza liczba prób wizualizowana była na 8-dołkowym żelu, a większa liczba na 15- i 20-dołkowym żelu. Do przygotowania podanego stężenia żelu agarozowego użyto buforu SB składającego się z kwasu borowego (45 g/l) (PPH) oraz wodorotlenku sodu (8 g/l) (POCH). Uzyskany w ten sposób 20x stężony bufor do elektroforezy doprowadzono do stężenia 1x. Następnie bufor w odpowiedniej objętości dodawany był do agarozy. Do żelu 8-dołkowego dodawano 35 ml buforu, natomiast do żelu 15- lub 20-dołkowego dodawano 70 ml buforu SB. Po rozpuszczeniu agarozy z użyciem mikrofalówki firmy Menuet dodawano 3 µl lub 5 µl barwnika Midori Green Advance firmy ABO w zależności od planowanego rozmiaru żelu. Następnie na spolimeryzowany żel nanoszono przygotowane próbki DNA. Każda próba nakładana do dołka żelu zawierała 3 µl dH_2O, 1 µl 6x stężonego buforu obciążającego (A&A Biotechnology) oraz 2 µl DNA po reakcji PCR. Do oznaczania masy uzyskanego produktu PCR zastosowano marker masy GeneRuller (ThermoFisher Scientific) lub DNA Marker 3 (A&A Biotechnology) w zależności od wielkości poszukiwanego produktu. Elektroforeza agarozowa przeprowadzana była w napięciu stałym 120V w czasie 30 minut dla żelu 8-dołkowego oraz 40 minut dla żelu 15- i 20-dołkowego. Do wizualizacji obrazu produktu PCR na elektroforezie używano system dokumentacji żeli PXI firmy Syngene.

12.6. Analiza długości O-swoistego łańcucha LPS

Kolejny eksperyment przeprowadzony na izolatach *S. liquefaciens* i *S. marcescens* dotyczył analizy długości O-swoistego łańcucha LPS. Do izolacji LPS z testowanych izolatów zastosowano metodę z proteinazą K, a rozdział LPS został wykonany z użyciem elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE.

Rycina 7. Procedura izolacji LPS z proteinazą K [102]



Izolację LPS rozpoczęto od założenia hodowli płynnej w podłożu Nutrient Broth w temperaturze 37°C przez 24 godziny z wytrząsaniem (Ryc. 7). Po inkubacji 1,5 ml hodowli przeniesiono do probówki typu Eppendorf. Następnie wirowano przy 13 tys.xg przez 15 minut w temperaturze 4°C w wirówce marki Heraeus FRESCO 21 firmy ThermoFisher Scientific. Po zwirowaniu prób uzyskany supernatant odrzucono. Do pozostawionego osadu dodano 200 µl buforu do prób.

Bufor do prób LPS

- Tris 1,211 g
- EDTA 0,5984 g
- Glicerol 16,26 ml
- SDS 8 g
- Błękit bromofenolowy 5 mg

Następnie próbki gotowano przez 10 minut w temperaturze 100°C w termobloku firmy StarLab. Po upływie wyznaczonego czasu do prób dodano 40 µl roztworu proteinazy K (A&A Biotechnology). Następnie kontynuowano inkubację w temperaturze 60°C przez 2 godziny. Po inkubacji wyizolowane preparaty LPS przechowywano w temperaturze 4°C oraz w -20°C.

Wizualizację długości O-swoistego łańcucha LPS prowadzono z wykorzystaniem elektroforezy SDS-PAGE [103] oraz metody barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem srebra. W pierwszym etapie przygotowano żel do elektroforezy SDS-PAGE składający się z 15% żelu dolnego rozdzielającego oraz 5% żelu górnego zagęszczającego. Celem uzyskania odpowiedniego stężenia poszczególnych żeli zmieszano ze sobą odpowiednie składniki, które zostały przestawione poniżej.

15% rozdzielający żel dolny

- dH_2O 1,645 ml
- Bufor dolny* 3,3 ml
- 30% akrylamid/bis-akrylamid 5 ml
- APS** 100 µl
- TEMED 10 µl

***Bufor dolny Tris-HCl pH 8.8**

- Tris 13,527 g
- SDS 300 mg
- dH_2O 100 ml

Tris rozpuszczono w objętości ok. 60 ml dH_2O. Następnie doprowadzono do pH 8.8 przez dodatek 1M HCl, dodano SDS i uzupełniono za pomocą dH_2O do 100 ml.

10% APS

- AP 0,1 g
- dH_2O 1 ml

5% żel zagęszczający górny Tris-HCl pH 6.8

- dH_2O 775 µl
- Bufor górny* 3,3 ml
- 30% akrylamid/bis-akrylamid 1,2 ml

- APS 50 µl
- TEMED 5 µl

***Bufor górny Tris-HCl**

- Tris 3,028 g
- SDS 200 mg
- dH_2O 100 ml

Tris rozpuszczono w objętości ok. 60 ml dH_2O. Następnie doprowadzono do pH 6.8 za pomocą 1M HCl, dodano SDS i uzupełniono za pomocą dH_2O do 100 ml

W pierwszej kolejności przygotowano zestaw do pionowej elektroforezy typu Mini-PROTEAN® Tetra Cell firmy BioRad. Następnie poprzez zmieszanie odpowiednich składników przygotowano 15% żel rozdzielający, który po wylaniu zalano wodą miliQ i pozostawiono na około 45 minut w celu polimeryzacji. W następnej kolejności przygotowano 5% żel zagęszczający, w którym po wylaniu umieszczono grzebień. Całość pozostawiono na 30 minut w celu polimeryzacji żelu górnego. Tak przygotowany żel poliakrylamidowy przechowywano przez noc w warunkach wilgotnych w temperaturze 4°C.

Następnego dnia wyizolowane próby LPS rozcieńczano do stężenia około 2 µg/µl poprzez dodanie 100 µl buforu do LPS, 60 µl dH_2O oraz 40 µl próby LPS danego szczepu. Tak przygotowaną próbkę nanoszono do poszczególnych dołków w objętości 10 µl. W następnej kolejności do zmontowanego zestawu do elektroforezy pionowej modelu Mini-PROTEAN® Tetra Cell firmy BioRad dodawano buforu do elektrod 1x stężonego.

Bufor do elektrod 4x stężony

- Tris 12 g
- Glicyna 57,6 g
- SDS 4 g

Składniki wymieszano za pomocą mieszadła magnetycznego w objętości 1000 ml dH_2O. Do elektroforezy używano buforu 1x stężonego.

Odpowiednie stężenie tego buforu uzyskano poprzez zmieszanie ze sobą 250 ml buforu oraz 750 ml dH_2O. Bufor do elektrod dodawano w pierwszej kolejności do zbiornika mniejszego utworzonego przez umieszczone w zestawie szkiełka z żelami poliakrylamidowymi, a następnie bufor dolewano do większego zbiornika do wyznaczonego przez producenta poziomu. Elektroforezę w warunkach denaturujących prowadzono przy napięciu 100V przez czas około 2 godzin przy obserwacjach poziomu barwnika na żelu. Elektroforezę zatrzymywano po upływie około 10 minut po wypłynięciu barwnika.

Po zakończonej elektroforezie żel wyciągnięto z pomiędzy szkiełek i umieszczono w ceramicznym naczyniu. Do naczynia dodano roztworu utrwalającego i przechowywano przez noc w warunkach zaciemnienia i temperaturze pokojowej.

Roztwór utrwalający

- Alkohol metylowy 40 ml
- Kwas octowy 10 ml
- dH_2O 50 ml

Roztwór utleniający*

- Periodic acid 0,7 g
- dH_2O 100 ml

Roztwór barwiący*

- 0,1M NaOH 28 ml
- NH_4OH 2 ml
- 20% $AgNO_3$ 1g/5ml
- dH_2O 150 ml

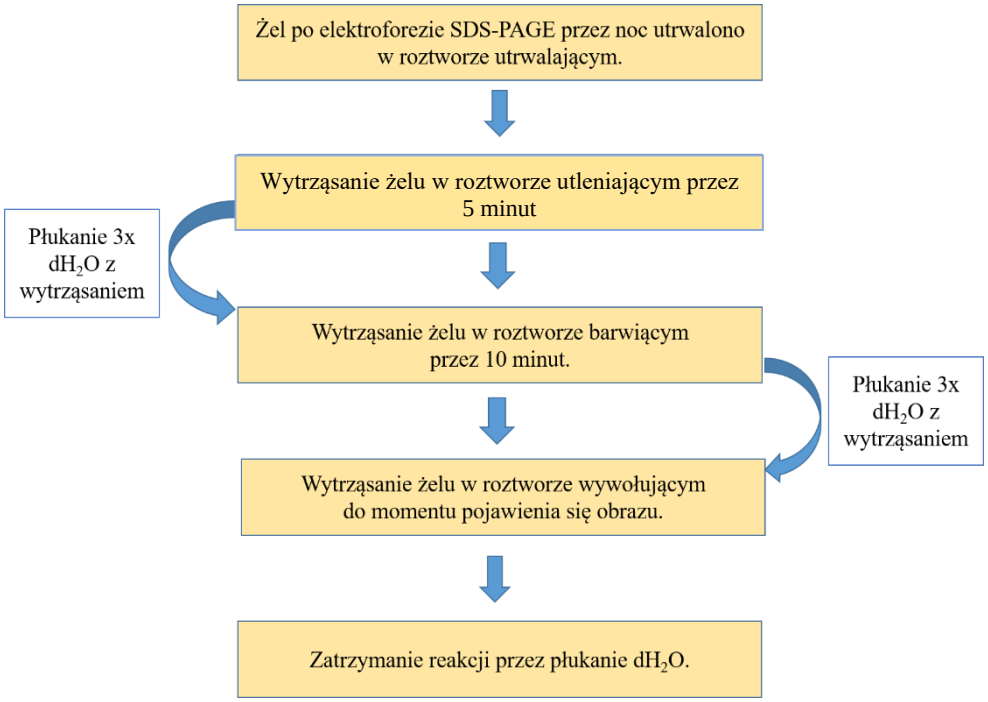
Roztwór wywołujący*

- Kwas cytrynowy 0,012 g
- 37% formaldehyd 125 µl
- dH_2O 250 ml

* Roztwory przygotowywane tuż przed ich użyciem.

Tym etapem rozpoczynano proces barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem srebra. W kolejnym dniu odlano roztwór utrwalający (0,7 g periodic acid (Sigma-Aldrich), 100 ml dH_2O), a żel wytrząsano przez 5 minut w roztworze utleniającym. Następnie 3-krotnie płukano żel z wytrząsaniem w dH_2O. Podczas trzeciego płukania żelu wodą przygotowywano roztwór barwiący. W tym celu w pierwszym etapie przygotowano 5 ml 20% roztworu azotanu srebra rozpuszczając 1g azotanu srebra $AgNO_3$ (PPH POCh) w 5 ml dH_2O. W kolejnym etapie przygotowano drugi roztwór zawierający około 100 ml dH_2O, 28 ml 0,1M NaOH (PPH POCh) oraz 2 ml roztworu NH_4OH (Chempur). W ostatnim etapie przygotowania roztworu barwiącego dodawano ostrożnie na mieszadle magnetycznym roztwór azotanu srebra do drugiego roztworu. Żel poliakrylamidowy wytrząsano w roztworze barwiącym przez 10 minut. Po tym czasie żel ponownie płukano dH_2O 3-krotnie przez 15 minut z wytrząsaniem. Po płukaniu do żelu dodano 250 ml roztworu wywołującego (0,012g kwasu cytrynowego (Chempur), 125 µl formaldehydu (POCH), 249,875 ml dH_2O). Żel wytrząsano z roztworem wywołującym do momentu uzyskania obrazu. Reakcję zatrzymano poprzez 3-krotne płukanie żelu dH_2O. Po zakończonym wybarwianiu żelu cyfrowy obraz rejestrowano za pomocą systemu do obrazowania żeli PXi 6 firmy Syngene.

Rycina 8. Procedura barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem srebra [104,105]



12.7. Analiza poziomu wrażliwości bakterii na działanie ludzkiej surowicy

W celu określenia poziomu wrażliwości komórek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakteriobójcze działanie surowicy dany izolat początkowo inkubowano w płynnym podłożu LB (Luria-Bertani Broth, Biocorp). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 18 godzin z opcją wytrząsania. Następnie po tym czasie do probówki ze świeżym płynnym podłożem LB przeniesiono 500 µl hodowli płynnej i kontynuowano inkubację w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Inkubację zakończono w momencie uzyskania zawiesiny komórek bakteryjnych o OD_{600} wynoszącej około 0,3. W kolejnym kroku całość odświeżonej hodowli płynnej wirowano w wirówce przy parametrach 4 tys. RPM / 4°C / 20 minut. Po zwirowaniu uzyskany osad zawieszono w roztworze PBS-u w objętości 3 ml. Uzyskaną zawiesinę komórek zmieszano w objętości 250 µl z 250 µl normalnej surowicy ludzkiej (NHS, Sigma-Aldrich) i inkubowano w temperaturze 37°C w łaźni wodnej przez 0, 60 oraz 180 minut. Określone czasy inkubacji w doświadczeniu oznaczono odpowiednio skrótami T_0, T_1 oraz T_3. Po upływie wyznaczonego czasu z inkubowanej mieszaniny pobierano objętość 100 µl i przygotowywano szereg rozcieńczeń do rozcieńczenia 10^7. Z każdego rozcieńczenia wysiewano na podłoże stałe AO (Biocorp) metodą spotową 10 µl mieszaniny i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18-24 godzin. Każdy wysiew wykonano z trzykrotnym powtórzeniem [106,107].

Powyżej opisane doświadczenie przeprowadzono również dla inaktywowanej normalnej surowicy ludzkiej (ITS – inaktywowana termicznie surowica, *ang. Heat Inactivated Serum*). Inaktywację składników układu dopełniacza przeprowadzono poprzez jej inkubację w temperaturze 56°C przez czas 30 minut. Inkubację z roztworem inaktywowanej surowicy traktowano jako kontrolę doświadczenia.

Analizę poziomu wrażliwości izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakteriobójcze działanie ludzkiej surowicy prowadzono poprzez pomiar liczby CFU/ml. Jako próbę ze 100% przeżywalnością komórek traktowano próby z czasu T_0 (0 minut). Szczepy, których wzrost zmieniał się w czasie, czyli dla których obserwowano wzrost liczby komórek względem ich liczby w czasie T_0, określono jako szczepy oporne. Czas T_0 traktowano również jako kontrolę techniczną eksperymentu.

13. Wyniki

13.1. Izolacja materiału mikrobiologicznego

CEL: Opracowanie metodologii izolacji materiału odzwierzęcego w kierunku pałeczek *Serratia* sp.

Prace eksperymentalne prowadzone w ramach realizacji dyplomowej pracy magisterskiej [108] pozwoliły przebadać materiał pobrany z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich i saren europejskich. W toku tych prac pozyskano 605 wymazów mikrobiologicznych od dzików oraz 93 wymazy mikrobiologiczne od saren. Wstępnie zidentyfikowane izolaty bakteryjne z wyżej wymienionego materiału zwierzęcego uzyskano wykorzystując metodę izolacji ITC/CIN. W wyniku tych działań uzyskano 460 izolatów bakteryjnych z wymazów z jamy nosowo-gardłowej dzików oraz 82 izolaty bakteryjne z jamy nosowo-gardłowej saren (Tab. 12).

Prowadzona izolacja materiału mikrobiologicznego pozyskanego z 55 tusz krów domowych pozwoliła na pozyskanie 228 izolatów z jamy nosowo-gardłowej oraz 208 izolatów z odbytnicy. Z 228 izolatów z jamy nosowo-gardłowej, 110 izolatów zostało wyizolowanych na podłożu CT agar, natomiast 118 izolatów zostało wyizolowanych na podłożu DNAse LAB agar. Z kolei z 208 izolatów pozyskanych z odbytnicy krów, 76 izolatów uzyskano na podłożu CT agar, a 132 izolatów uzyskano na podłożu DNAse LAB agar (Tab. 12). Różnice w liczbie wyizolowanych bakterii na podłożu są wynikiem selektywności podłoża CT i braku zastosowania selektywności w podłożu DNAse. W pracy doktorskiej zastosowano te dwa różne podłoża celem zwiększenia efektywności izolacji pałeczek z rodzaju *Serratia*.

Materiał pozyskany z 24 tusz świń domowych z województwa opolskiego pozwolił na pozyskanie 82 izolatów z górnego odcinka przewodu pokarmowego oraz 70 izolatów z dolnego odcinka przewodu pokarmowego tusz świń domowych. W wyniku prowadzonej izolacji na podłożu CT agar z gardła świń pozyskano 27 izolaty, a na podłożu DNAse LAB agar 55 izolatów. Z 70 izolatów uzyskanych z odbytu świń 32 zostały wyhodowane na podłożu CT agar, natomiast 38 izolatów zostało wyhodowanych na podłożu DNAse LAB agar (Tab. 12).

Z 35 wymazów mikrobiologicznych pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej tusz świń domowych z województwa wielkopolskiego pozyskano łącznie 118 izolatów. W wyniku prowadzonej izolacji na podłożu CT agar uzyskano 60 izolatów bakteryjnych, natomiast na podłożu DNAse LAB agar pozyskano 58 izolatów (Tab. 12).

Tabela 12. Zestawienie wyników izolacji bakterii Gram-ujemnych z tusz badanych zwierząt wolno żyjących i rzeźnych

Źródło	Liczba pobranych wymazów	Liczba uzyskanych izolatów (łącznie)	Liczba izolatów z jamy nosowo-gardłowej	Liczba izolatów z odbytnicy
Dzik euroazjatycki	605	460	460	x
Sarna europejska	93	82	82	x
Krowa domowa	55	436	228[a]	208[b]
Świnia domowa	24 (województwo opolskie)	152	82[c]	70[d]
	35 (województwo wielkopolskie)	118	118[e]	x
	Σ=812	Σ=1248	Σ=970	Σ=278

Legenda:

[a]110 izolatów wyhodowano na podłożu CT, 118 izolatów wyhodowano na podłożu DNAse
[b]76 izolatów wyhodowano na podłożu CT, 132 izolaty wyhodowano na podłożu DNAse
[c]27 izolatów wyhodowano na podłożu CT, 55 izolatów wyhodowano na podłożu DNAse
[d]32 izolaty wyhodowano na podłożu CT, 38 izolatów wyhodowano na podłożu DNAse
[e]58 izolatów wyhodowano na podłożu CT, 60 izolatów wyhodowano na podłożu DNAse
x - brak pozyskanego materiału do badań

Zastosowana technika izolacji materiału mikrobiologicznego z jednoczesną hodowlą materiału na podłożu DNAse LAB agar i CT agar pozwoliła na pozyskanie izolatów bakteryjnych z każdego źródła oraz zwiększenie prawdopodobieństwa izolacji poszukiwanych pałeczek z rodzaju *Serratia*.

Wszystkie izolaty przedstawione w Tab. 12 zostały poddane identyfikacji dzięki zastosowaniu metody MALDI Biotyper. Wyniki tej identyfikacji zawarte zostały w rozdziale 13.2.

13.2. Wyniki identyfikacji bakterii Gram-ujemnych

CEL: Określenie częstości występowania *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w izolatach pozyskanych z tusz dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów domowych i świń domowych.

Tabela 13. Zestawienie wyników identyfikacji pozyskanych bakterii Gram-ujemnych od badanych zwierząt

Badane zwierzę	Źródło pozyskania izolatu	Liczba pozyskanych izolatów	Liczba izolatów oznaczonych za pomocą MALDI Biotyper	Liczba izolatów nieoznaczonych za pomocą MALDI Biotyper
Dzik euroazjatycki	Jama nosowo-gardłowa	460	421	39
	Odbytnica	x	x	x
Sarna europejska	Jama nosowo-gardłowa	82	70	12
	Odbytnica	x	x	x
Krowa domowa	Jama nosowo-gardłowa	228	206	22
	Odbytnica	208	195	13
Świnia domowa	Jama nosowo-gardłowa	200	188	12
	Odbytnica	70	58	12
		Σ=1248	Σ=1138	Σ=110

W Tab. 13 przedstawione zostało zestawie wyników izolacji bakterii pozyskanych z tusz dzików euroazjatyckich, saren europejskich oraz krów i świń domowych. Z użyciem metody identyfikacji MALDI Biotyper przyporządkowano do poziomu rodzaju i gatunku 421 izolatów z tusz dzików europejskich, 71 izolatów z tusz saren europejskich oraz 401 izolatów z tusz krów domowych (206 - jama nosowo-gardłowa, 195 - odbytnica) i 246 izolatów z tusz świń domowych (188 - jama nosowo-gardłowa, 58 - odbytnica). Przyporządkowanie identyfikowanych bakterii oparto na uzyskanych „scorach" analizy mieszczących się w granicach wartości od 2.000 do 3.000 (Rozdział 11.2). Dla niektórych analizowanych izolatów uzyskano wartości „score" w granicach od 0.000 do 1.999, co oznaczało brak identyfikacji. Takie wartości otrzymano dla 39 izolatów z tusz dzików europejskich, 11 izolatów z tusz saren europejskich, 35 izolatów z tusz krów domowych (13 - jama nosowo-gardłowa, 13 - odbytnica) oraz 24 izolatów z tusz świń domowych (12 - jama nosowo-gardłowa, 12 - odbytnica).

13.2.1. Identyfikacja Gram-ujemnych bakterii z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich

Dzięki wykorzystaniu metody MALDI Biotyper zidentyfikowano 421 z 460 pozyskanych izolatów bakteryjnych od dzików euroazjatyckich. Z pozyskanej puli izolatów nie udało się dokonać identyfikacji gatunkowej 39 izolatów (Tab. 13).

Proteomiczna analiza izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej tusz dzików euroazjatyckich pozwoliła na przyporządkowanie izolatów do 10 rodzajów bakterii Gram-ujemnych. Rodzaje te były identyfikowane z różną częstością. Największa liczba izolatów została przyporządkowana do rodzaju *Rahnella* i stanowiła 32% (137/421) identyfikacji oraz do rodzaju ***Serratia*** co stanowiło **30% (128/421)** identyfikowanych bakterii. Częstość identyfikacji bakterii sklasyfikowanych do pozostałych rodzajów wynosiła odpowiednio: *Ewingella* sp. 10% (44/421), *Morganella* sp. 9% (35/421), *Providencia* sp. 5% (21/421), *Erwinia* sp. 4% (18/421), *Citrobacter* sp. 3% (16/421), *Aeromonas* sp. 2% (7/421), *Pseudomonas* sp. 2% (7/421) oraz *Yersinia* sp. 2% (8/421).

Zdecydowana większość izolatów bakteryjnych, należących do bakterii Gram-ujemnych, z jamy nosowo-gardłowej tusz dzików euroazjatyckich została zidentyfikowana do poziomu gatunku. Bakterie zidentyfikowane do poziomu gatunku stanowią 99,8% wszystkich poddanych identyfikacji izolatów. Wyniki analizy MALDI Biotyper pokazały (Tab. 14), że w jamie nosowo-gardłowej występowały następujące gatunki z rodzaju *Aeromonas*: *A. salmonicida* (4/421), *A. bestiarium* (1/421), *A. media* (1/421) i *Aeromonas* sp. (1/421), z rodzaju *Citrobacter*: *C. amalonaticus* (1/421), *C. braaki* (12/421), *C. freundii* (3/421) oraz z rodzaju *Erwinia*: *E. rhapontici* (2/421) i *E. persicina* (16/421). Za pomocą tej metody zidentyfikowano też bakterie należące do gatunku *Ewingella americana* (44/421) i *Morganella morganii* (35/421) oraz gatunki należące do rodzaju *Providencia*: *P. rettgeri* (18/421) i *P. alcalifaciens* (3/421), rodzaju *Pseudomonas*: *P. chlororaphis* (1/421), *P. extremorientalis* (1/421), *P. libanensis* (1/421), *P. monteilii* (1/421), *P. proteolytica* (1/421) oraz *P. putida* (2/421), rodzaju ***Serratia*: *S. fonticola* (31/421), *S. liquefaciens* (86/421), *S. marcescens* (5/421), *S. plymuthica* (4/421), *S. quinivorans* (1/421) oraz *S. ureilytica* (1/421)**, rodzaju *Yersinia*: *Y. bercovieri* (1/421), *Y. enterocolitica* (5/421), *Y. frederiksenii* (1/421), *Y. kristensenii* (1/421) oraz do gatunku *Rahnella aquatilis* (137/421).

Tabela 14. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Aeromonas salmonicida*	4
2	*Aeromonas bestiarium*	1
3	*Aeromonas media*	1
4	*Aeromonas* sp.	1
5	*Citrobacter amalonaticus*	1
6	*Citrobacter braaki*	12
7	*Citrobacter freundii*	3
8	*Erwinia rhapontici*	2
9	*Erwinia persicina*	16
10	*Ewingella americana*	44
11	*Morganella morganii*	35
12	*Providencia rettgeri*	18
13	*Providencia alcalifaciens*	3
14	*Pseudomonas chlororaphis*	1
15	*Pseudomonas extemorientalis*	1
16	*Pseudomonas libanensis*	1
17	*Pseudomonas monteilii*	1
18	*Pseudomonas proteolytica*	1
19	*Pseudomonas putida*	2
20	*Rahnella aquatilis*	137
21	***Serratia fonticola***	**31**
22	***Serratia liquefaciens***	**86**
23	***Serratia marcescens***	**5**
24	***Serratia plymuthica***	**4**
25	***Serratia quinivorans***	**1**
26	***Serratia ureilytica***	**1**
27	*Yersinia bercovieri*	1
28	*Yersinia enterocolitica*	5
29	*Yersinia frederiksenii*	1
30	*Yersinia kristensenii*	1
		Σ=421

13.2.2. Identyfikacja Gram-ujemnych bakterii z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich

Proteomiczna analiza pozyskanych izolatów z jamy nosowo-gardłowej tusz saren europejskich pozwoliła na zidentyfikowanie 36 z 71 izolatów.

Zidentyfikowane bakterie należały do 9 rodzajów bakterii Gram-ujemnych. Najczęściej występującymi rodzajami pozyskanymi od saren były *Rahnella* 38% (27/71) oraz ***Serratia* 25% (18/71)**. Pozostałe izolaty bakteryjne klasyfikowane były do rodzajów *Pseudomonas* 11% (8/71), *Ewingella* 8% (6/71), *Erwinia* 7% (5/71), *Shewanella* 5% (4/71) oraz *Aeromonas* 1% (1/71), *Morganella* 1% (1/71) i *Yersinia* 1% (1/71).

W obrębie przedstawionych powyżej rodzajów zidentyfikowanych bakterii metoda MALDI Biotyper pozwoliła na przyporządkowanie izolatów do poziomu gatunku na podstawie uzyskanych widm mieszaniny białek. Lista uzyskanych gatunków bakterii została przedstawiona w Tab. 15. Tabela ta pokazuje, że w przeważającej liczbie izolaty bakteryjne zostały przyporządkowane do gatunku *Rahnella aquatilis* (27/71). Gatunek ten był również jedynym przedstawicielem całego rodzaju *Rahnella* w danej identyfikacji. Wśród rodzaju *Serratia* identyfikowane były gatunki takie jak: ***S. liquefaciens* (15/71)**, ***S. entomophila* (1/71)**, ***S. fonticola* (1/71)** oraz ***S. quinivorans* (1/71)**. Różnorodność gatunkową stwierdzono również w obrębie rodzaju *Pseudomonas*. Do identyfikowanych gatunków należały: *P. antarctica* (1/71), *P. fluorescens* (2/71), *P. fragi* (1/71), *P. gessardii* (2/71), *P. grimontii* (1/71) oraz *P. libanensis* (1/71). Pozostałe izolaty zostały przyporządkowane do następujących gatunków: *Aeromonas salmonicida* (1/71), *Erwinia persicina* (5/71), *Ewingella americana* (6/71), *Morganella morganii* (1/71), *Shewanella baltica* (4/71) oraz *Yersinia enterocolitica* (1/71). Gatunki te podobnie do *R. aquatilis* były jedynymi przedstawicielami tych rodzajów identyfikowanych u saren europejskich.

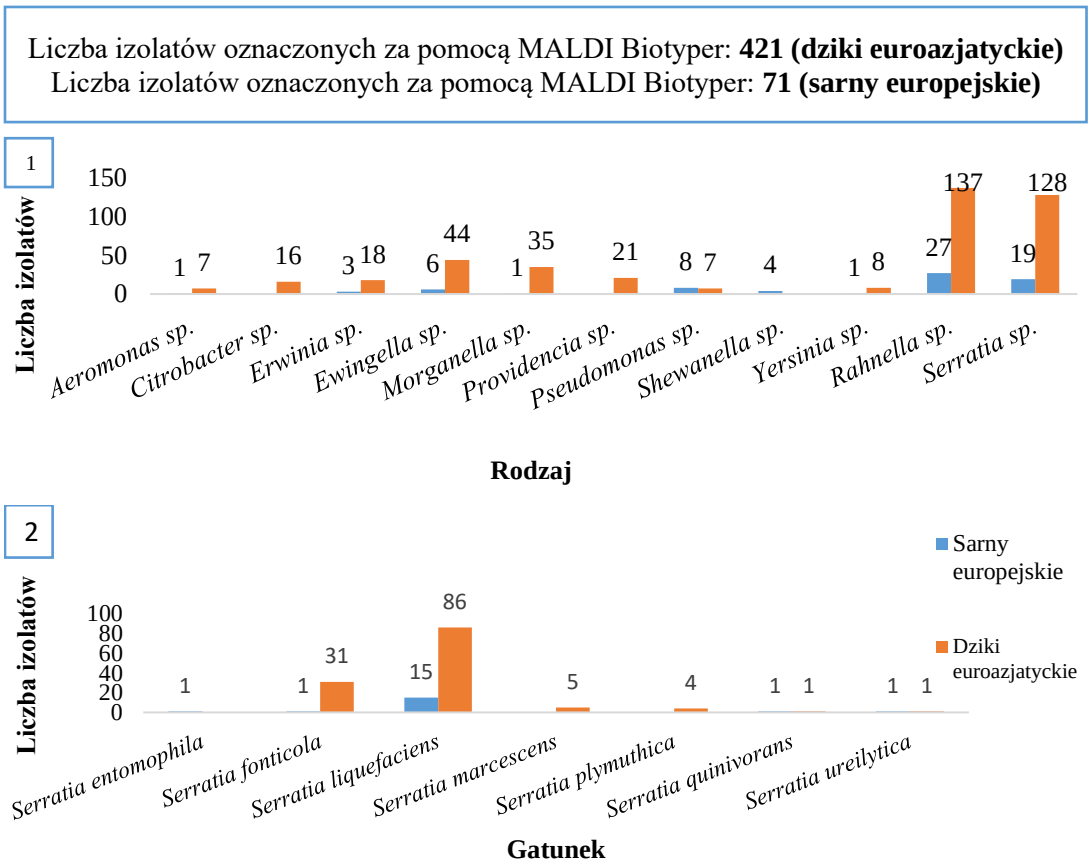
Tabela 15. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Aeromonas salmonicida*	1
2	*Erwinia persicina*	5
3	*Ewingella americana*	6
4	*Morganella morganii*	1
5	*Pseudomonas antarctica*	1
6	*Pseudomonas fluorescens*	2
7	*Pseudomonas fragi*	1
8	*Pseudomonas gessardii*	2
9	*Pseudomonas grimontii*	1
10	*Pseudomonas libanensis*	1
11	*Rahnella aquatilis*	27
12	***Serratia entomophila***	**1**
13	***Serratia fonticola***	**1**
14	***Serratia liquefaciens***	**15**
15	***Serratia quinivorans***	**1**
16	*Shewanella baltica*	4
17	*Yersinia enterocolitica*	1
		Σ=71

Ryc. 9.1 przedstawia zestawienie porównawcze identyfikacji izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej tusz dzików euroazjatyckich i tusz saren europejskich. Przedstawione wyniki wskazują najczęstsze występowanie u wymienionych zwierząt bakterii z rodzajów *Rahnella* i *Serratia*. Z mniejszą częstością identyfikowane były rodzaje *Erwinia, Ewingella, Aeromonas, Morganella, Yersinia* i rodzaj *Pseudomonas*. Wyniki przedstawione na wykresie pokazują również, że bakterie z rodzajów *Citrobacter* oraz *Providencia* występowały wyłącznie u dzików euroazjatyckich. Natomiast rodzaj *Shewanella* identyfikowany był wyłącznie u saren europejskich.

Zestawienie gatunkowe zaprezentowane na Ryc. 9.2 pokazuje, że zarówno od dzików euroazjatyckich i saren europejskich najczęściej identyfikowanym gatunkiem był gatunek *S. liquefaciens*. Gatunki *S. fonticola, S. qunivorans* i *S. ureilytica* występowały u obu badanych zwierząt, ale z mniejszą częstością. *S. entomophila* izolowana była wyłącznie od saren europejskich, natomiast *S. marcescens* i *S. plymuthica* izolowane były wyłącznie od dzików euroazjatyckich.

Rycina 9. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich i dzików euroazjatyckich



Legenda:

1 – wykres przedstawiający rodzaje oznaczonych bakterii, 2 – wykres przedstawiający oznaczone gatunki w obrębie rodzaju *Serratia*

13.2.3. Identyfikacja Gram-ujemnych bakterii jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych

Zastosowana technika analizy izolatów bakteryjnych z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy tusz krów domowych pozwoliła na zidentyfikowanie 206/224 (92%) oraz 195/208 (94%) izolatów. Z jamy nosowo-gardłowej nie udało się dokonać identyfikacji gatunkowej 18 izolatów (8%), a z odbytnicy 13/208 (6%) izolatów nie zostało zidentyfikowanych.

Analizy proteomiczne zidentyfikowanych izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej przyporządkowały je do 15 różnych rodzajów w obrębie grupy bakterii Gram-ujemnych. Identyfikowanymi rodzajami były: *Pseudomonas* 34% (71/206), ***Serratia* 20% (42/206),** *Citrobacter* 15% (30/206), *Providencia* 11% (22/206), *Morganella* 5% (11/206), *Klebsiella* 4% (9/206), *Aeromonas* 2% (6/206), *Escherichia* 2% (5/206), *Enterobacter* 1% (2/206), *Myroides* (1% (2/206), *Raoultella* 1% (2/206) oraz *Kluyvera* 0,5% (1/206), *Leclercia* 0,5% (1/206), *Shewanella* 0,5% (1/206) i *Stenotrophomonas* 0,5% (1/206).

Izolaty bakteryjne pozyskane z odbytnicy poprzez zastosowanie metody MALDI Biotyper sklasyfikowane zostały do 14 różnych rodzajów w obrębie grupy bakterii Gram-ujemnych. Występującymi rodzajami bakterii w analizowanym miejscu były: *Pseudomonas* 28% (56/195), *Providencia* 19% (37/195), *Citrobacter* 14% (28/195), *Escherichia* 11% (21/195), ***Serratia* 8% (16/195)**, *Klebsiella* 5% (10/195), *Morganella* 4% (8/195), *Aeromonas* 2% (4/195), *Shewanella* 2% (4/195), *Myroides* 1,5% (3/195), *Proteus* 1,5% (3/195), *Stenotrophomonas* 1,5% (3/195) oraz *Acinetobacter* 0,5% (1/195) i *Buttiauxella* 0,5% (1/195).

W Tab. 16 zaprezentowano przyporządkowanie przedstawionych rodzajów izolatów bakterii z jamy nosowo-gardłowej krów do poziomu gatunku. Analizując zaprezentowane wyniki można zauważyć, że w obrębie rodzaju *Aeromonas* występowały gatunki takie jak: *A. caviae* (4/206), *A. media* (1/206), *A. popofii* (1/206). Rodzaj *Citrobacter* stanowiły gatunki *C. amalonaticus* (1/206), *C. braakii* (10/206), *C. freundii* (12/206), *C. gillenii* (2/206) i *C. koseri* (1/206). Wyłącznie do poziomu rodzaju zostały sklasyfikowane 4/206 izolaty. Z gardła krów domowych zostały również zidentyfikowane bakterie z gatunków *Enterobacter cloacae* (2/206), *Escherichia coli* (5/206), *Leclercia adecarboxylata* (1/206), *Morganella morganii* (11/206), *Myroides odoratimimus* (2/206), *Shewanella profunda* (1/206) i *Stenotrophomonas maltophila* (1/206). W obrębie rodzaju *Klebsiella* oznaczono gatunki *K. pneumoniae* (7/206) oraz *K. oxytoca* (2/206). Rodzaj *Providencia* stanowiły gatunki: *P. alcalifaciens* (7/206) *P. rettgeri* (13/206) i *P. vermicola* (2/206). W obrębie rodzaju *Pseudomonas* zidentyfikowano gatunki: *P. antarctica* (1/206), *P. brenneri* (1/206), *P. chlororaphis* (5/206), *P. corrugata* (1/206), *P. fluorescens* (4/206), *P. gessardii* (3/206), *P. grimontii* (1/206), *P. libanensis* (1/206), *P. putida* (13/206), *P. rhodesiae* (1/206) i *P. tolaasii* (1/2016). Dodatkowo 39/206 izolatów zostały przyporządkowanych wyłącznie do poziomu rodzaju *Pseudomonas*. Z rodzaju *Serratia* udało się zidentyfikować bakterie z gatunku ***S. fonticola* (3/206), *S. grimesii* (4/206), *S. liquefaciens* (22/206), *S. marcescens***

(7/206), *S. odorifera* (1/206) i *S. rubidaea* (4/206) oraz 1 izolat przyporządkowany wyłącznie do poziomu rodzaju *Serratia*.

Tabela 16. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej krów domowych

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Aeromonas caviae*	4
2	*Aeromonas media*	1
3	*Aeromonas popofii*	1
4	*Citrobacter amalonaticus*	1
5	*Citrobacter braakii*	10
6	*Citrobacter freundii*	12
7	*Citrobacter gillenii*	2
8	*Citrobacter koseri*	1
9	*Citrobacter* sp.	4
10	*Enterobacter cloacae*	2
11	*Escherichia coli*	5
12	*Klebsiella oxytoca*	2
13	*Klebsiella pneumoniae*	7
14	*Kluyvera* sp.	1
15	*Leclercia adecarboxylata*	1
16	*Morganella morganii*	11
17	*Myroides odoratimimus*	2
18	*Providencia alcalifaciens*	7
19	*Providencia rettgeri*	13
20	*Providencia vermicola*	2
21	*Pseudomonas antarctica*	1
22	*Pseudomonas brenneri*	1
23	*Pseudomonas chlororaphis*	5
24	*Pseudomonas corrugata*	1
25	*Pseudomonas fluorescens*	4
26	*Pseudomonas gessardii*	3
27	*Pseudomonas grimontii*	1
28	*Pseudomonas libanensis*	1
29	*Pseudomonas putida*	13
30	*Pseudomonas rhodesiae*	1
31	*Pseudomonas* sp.	39
32	*Pseudomonas tolaasii*	1
33	*Raoultella ornithinolytica*	1
34	*Raoultella terrigena*	1
35	***Serratia fonticola***	**3**
36	***Serratia grimesii***	**4**
37	***Serratia liquefaciens***	**22**
38	***Serratia marcescens***	**7**
39	***Serratia odorifera***	**1**
40	***Serratia rubidaea***	**4**
41	***Serratia* sp.**	**1**
42	*Shewanella profunda*	1
43	*Stenotrophomonas maltophila*	1
		Σ=206

Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper izolatów pozyskanych z odbytnicy tusz krów domowych przedstawiono w Tab. 17. Zastosowana metoda pozwoliła na wyodrębnienie gatunku *Acinetobacter pittii* (1/195), *Buttiauxella noackieae* (1/195), *Morganella morganii* (8/195), *Myroides odoratimimus* (3/195) oraz *Stenotrophomoas maltophila* (3/195) i *Escherichia coli* (20/195). W obrębie rodzaju *Aeromonas* zidentyfikowano gatunki: *A. caviae* (3/195) i *A. hydrophila* (1/195), natomiast w obrębie rodzaju *Citrobacter* gatunki: *C. amalonaticus* (2/195), *C. braakii* (12/195) i *C. freundii* (13/195). Do poziomu rodzaju *Citrobacter* został sklasyfikowany 1 izolat. Z rodzaju *Klebsiella* oznaczono izolaty należące do gatunku: *K. oxytoca* (5/195) i *K. pneumoniae* (4/195). Rodzaj *Proteus* reprezentowały izolaty sklasyfikowane do gatunku: *P. hauseri* (1/195) i *P. vulgaris* (2/195), natomiast rodzaj *Providencia* reprezentowany był przez gatunki: *P. alcalifaciens* (19/195), *P. rettgeri* (12/195), *P. rustigianii* (2/195) i *P. vermicola* (2/195). Rodzaj *Pseudomonas* stanowiły izolaty zaliczone do gatunku: *P. antarctica* (1/195), *P. brenneri* (2/195), *P. chlororaphis*, (2/195), *P. corrugata* (1/195), *P. fluorescens* (2/195), *P. fulva* (1/195), *P. gessardii* (1/195), *P. libanensis* (1/195), *P. proteolytica* (1/195) i *P. putida* (17/195). W obrębie rodzaju *Serratia* zidentyfikowano izolaty z gatunków: ***S grimesii* (1/195), *S. liquefaciens* (8/195), *S. marcescens* (3/195) i *S. rubidaea* (4/195)**, natomiast do rodzaju *Shewanella* zaliczono gatunki: *S. baltica* (1/195), *S. profunda* (1/195) i *S. putriefaciens* (1/195). Niektóre z badanych izolatów zostały przyporządkowane wyłącznie do poziomu rodzaju. Był nim 1 izolat z rodzaju *Escherichia*, 1 izolat z rodzaju *Klebsiella*, 2 izolaty z rodzaju *Providencia* i 28 izolatów z rodzaju *Pseudomonas.*

Tabela 17. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z odbytnicy krów domowych

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Acinetobacter pittii*	1
2	*Aeromonas caviae*	3
3	*Aeromonas hydrophila*	1
4	*Buttiauxella noackiae*	1
5	*Citrobacter amalonaticus*	2
6	*Citrobacter braakii*	12
7	*Citrobacter freundii*	13
8	*Citrobacter* sp.	1
9	*Escherichia coli*	20
10	*Escherichia* sp.	1
11	*Klebsiella oxytoca*	5
12	*Klebsiella pneumoniae*	4
13	*Klebsiella* sp.	1
14	*Morganella morganii*	8
15	*Mycoides odoratimimus*	3
16	*Proteus hauseri*	1
17	*Proteus vulgaris*	2
18	*Providencia alcalifaciens*	19
19	*Providencia rettgeri*	12
20	*Providencia rustigianii*	2
21	*Providencia* sp.	2
22	*Providencia vermicola*	2
23	*Pseudomonas antarctica*	1
24	*Pseudomonas brenneri*	1
25	*Pseudomonas chlororaphis*	2
26	*Pseudomonas corrugata*	1
27	*Pseudomonas fluorescens*	2
28	*Pseudomonas fulva*	1
29	*Pseudomonas gessardii*	1
30	*Pseudomonas libanensis*	1
31	*Pseudomonas proteolytica*	1
32	*Pseudomonas putida*	17
33	*Pseudomonas* sp.	28
34	***Serratia grimesii***	**1**
35	***Serratia liquefaciens***	**8**
36	***Serratia marcescens***	**3**
37	***Serratia rubidaea***	**4**
38	*Shewanella baltica*	1
39	*Shewanella profunda*	1
40	*Shewanella putriefaciens*	1
41	*Shewanella* sp.	1
42	*Stenotrophomonas maltophilia*	3
		Σ=195

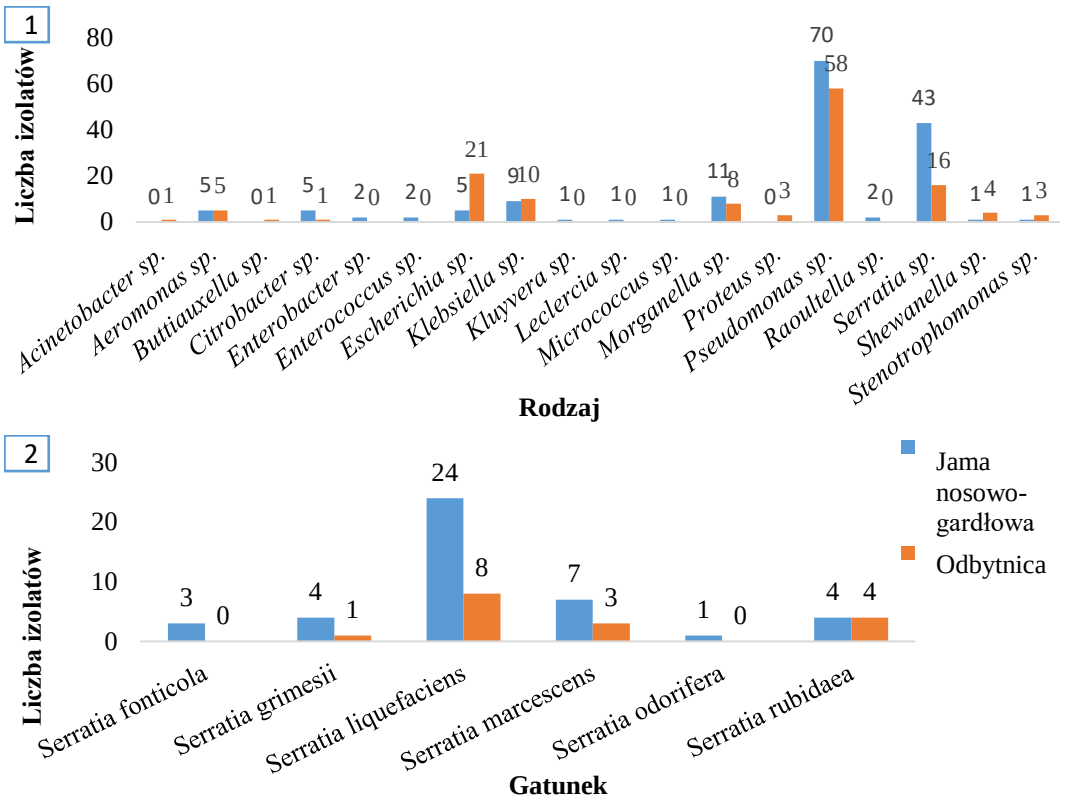
Porównanie rodzajowe i gatunkowe zidentyfikowanych izolatów przedstawiono poniżej na Ryc. 10. Analizując zamieszczone na nim dane można

wnioskować, że zarówno w jamie nosowo-gardłowej jak i odbytnicy krów domowych występowały bakterie z rodzajów *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Shewanella* i *Stenotrophomonas*. Do najczęściej identyfikowanych rodzajów również występujących w jamie nosowo-gardłowej i odbytnicy, należały rodzaje *Pseudomonas* i *Serratia*. W jamie nosowo-gardłowej występowały także bakterie, których nie wyizolowano z odbytnicy tj. *Enterobacter* sp., *Kluyvera* sp., *Leclercia* sp. i *Raoultella* sp. Z kolei w odbytnicy występowały rodzaje *Acinetobacter*, *Buttiauxella* i *Proteus*, których nie wyizolowano z jamy nosowo-gardłowej krów domowych.

Zestawienie gatunkowe identyfikacji bakterii z rodzaju *Serratia* pokazuje, że gatunki *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens* i *S. rubidaea* występowały w jamie nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych. Jednakże najczęściej identyfikowanym gatunkiem była *S. liquefaciens*. Pozostałe gatunki, *S. fonticola* i *S. odorifera*, występowały wyłącznie w jamie nosowo-gardłowej krów domowych.

Rycina 10. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych

Liczba izolatów oznaczonych za pomocą MALDI Biotyper: **206**
(jama nosowo-gardłowa)
Liczba izolatów oznaczonych za pomocą MALDI Biotyper: 1**95**
(odbytnica)



Legenda:

1 – wykres przedstawiający rodzaje oznaczonych bakterii, 2 – wykres przedstawiający oznaczone gatunki w obrębie rodzaju *Serratia*

13.2.4. Identyfikacja Gram-ujemnych bakterii z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy świń domowych

Z wykorzystaniem metody MALDI Biotyper zidentyfikowano 188/200 izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej tusz świń domowych. Z kolei z odbytnicy świń domowych 58/70 izolatów zostało zidentyfikowanych. Z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy świń domowych nie udało się zidentyfikować 12/200 oraz 12/70 izolatów.

Ze 188 poddanych identyfikacji izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej, wyszczególniono 15 różnych rodzajów bakterii Gram-ujemnych. Najwięcej izolatów zostało przyporządkowanych do rodzaju *Pseudomonas* (67/188; 35%), a najmniej do rodzajów *Proteus* (1/188, 0,5%), *Hafnia* (1/188, 0,5%) i *Shewanella* (1/188; 0,5%). Bardzo często izolowane były bakterie należące do rodzajów: ***Serratia* (43/188; 23%)** i *Aeromonas* (35/188; 18%). Ze średnią częstością występowały bakterie sklasyfikowane do rodzajów: *Citrobacter* (12/188; 6%), *Escherichia* (7/188; 3%), *Yersinia* (4/188; 2%), *Enterobacter* (3/188; 1,5%), *Kluyvera* (2/188; 1%), *Raoultella* 2/188; 1%) i *Stenotrophomonas* (2/188; 1%).

Izolaty pozyskane z odbytnicy (58/70) zostały przyporządkowane do 9 rodzajów bakterii Gram-ujemnych. Przeważająca liczba izolatów należała do rodzaju *Pseudomonas* (33/58; 57%). Pozostałe rodzaje identyfikowane były z mniejszą częstością: *Aeromonas* (5/58; 8%), *Providencia* (4/58; 7%), ***Serratia* (3/58; 5%)**, *Citrobacter* (2/58; 3%), *Klebsiella* (1/58; 1,7%), *Kluyvera* (1/58; 1,7%) oraz *Shewanella* (1,7%).

W Tab. 18 zaprezentowano przyporządkowanie zidentyfikowanych rodzajów bakterii do poziomu gatunku. Przedstawicielami rodzaju *Aeromonas* były gatunki: *A. bestiarum* (1/188), *A. caviae* (3/188), *A. eucrenophila* (2/188), *A. hydrophila* (1/188), *A. media* (13/188), *A. popoffii* (5/188), *A. salmonicida* (4/188) oraz *A. veronii* (2/188). Rodzaj *Citrobacter* stanowiły gatunki taki jak: *C. braakii* (8/188), *C. freundii* (1/188), *C. gillenii* (1/188) oraz *C. koseri* (2/188), natomiast rodzaj *Enterobacter* gatunki: *E. cloacae* (1/188) i *E. kobei* (1/188). Identyfikowanymi gatunkami bakterii były również *Escherichia coli* (6/188), *Klebsiella pneumoniae* (5/188), *Kluyvera intermedia* (2/188), *Proteus vulgaris* (1/188), *Providencia rettgerii* (3/188), *Raoultella ornithinolytica* (2/188), *Shewanella baltica* (1/188), *Stenotrophomonas maltophila* (1/188) oraz *Yersinia enterocolitica* (4/188). W obrębie rodzaju *Pseudomonas* oznaczono gatunki: *P. aeruginosa* (2/188), *P. antarctica* (2/188), *P. brassicacearum* (1/188), *P. brenneri* (4/188), *P. chlororaphis* (1/188), *P. fluorescens* (4/188), *P. gessardii* (2/188), *P. kilonensis* (1/188), *P. koreensis* (1/188), *P. libanensis* (2/188), *P. orientalis* (1/188), *P. proteolytica* (4/188), *P. rhodesiae* (5/188), *P. synxantha* (4/188), *P. taetrolens* (2/188), *P. tolaasii* (1/188) oraz *P. veronii* (11/188). Rodzaj *Serratia* stanowiły natomiast gatunki ***S. grimesii* (1/188), *S. liquefaciens* (27/188), *S. marcescens* (11/188), *S. proteamaculans* (3/188) oraz *S. rubidaea* (1/188)**. Niektóre izolaty nie zostały przyporządkowane do poziomu gatunku, jedynie do poziomu rodzaju. Taką

klasyfikację uzyskały izolaty z rodzaju *Aeromonas* (4/188), *Enterobacter* (1/188), *Escherichia* (1/188), *Hafnia* (1/188) i *Pseudomonas* (19/188).

Tabela 18. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z jamy nosowo-gardłowej świń domowych

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Aeromonas bestiarum*	1
2	*Aeromonas caviae*	3
3	*Aeromonas eucrenophila*	2
4	*Aeromonas hydrophila*	1
5	*Aeromonas media*	13
6	*Aeromonas popoffii*	5
7	*Aeromonas salmonicida*	4
8	*Aeromonas* sp.	4
9	*Aeromonas veronii*	2
10	*Citrobacter braakii*	8
11	*Citrobacter freundii*	1
12	*Citrobacter gillenii*	1
13	*Citrobacter koseri*	2
14	*Enterobacter cloacae*	1
15	*Enterobacter kobei*	1
16	*Enterobacter* sp.	1
17	*Escherichia coli*	6
18	*Escherichia* sp.	1
19	*Hafnia* sp.	1
20	*Klebsiella pneumoniae*	5
21	*Kluyvera intermedia*	2
22	*Proteus vulgaris*	1
23	*Providencia rettgeri*	3
24	*Pseudomonas aeruginosa*	2
25	*Pseudomonas antarctica*	2
26	*Pseudomonas brassicacearum*	1
27	*Pseudomonas brenneri*	4
28	*Pseudomonas chlororaphis*	1
29	*Pseudomonas fluorescens*	4
30	*Pseudomonas gessardii*	2
31	*Pseudomonas kilonensis*	1
32	*Pseudomonas koreensis*	1
33	*Pseudomonas libanensis*	2
34	*Pseudomonas orientalis*	1
35	*Pseudomonas proteolytica*	4
36	*Pseudomonas rhodesiae*	5
37	*Pseudomonas* sp.	19
38	*Pseudomonas synxantha*	4
39	*Pseudomonas taetrolens*	2
40	*Pseudomonas tolaasii*	1
41	*Pseudomonas veronii*	11
42	*Raoultella ornithinolytica*	2
43	***Serratia grimesii***	**1**
44	***Serratia liquefaciens***	**27**

45	***Serratia marcescens***	**11**
46	***Serratia proteamaculans***	**3**
47	***Serratia rubidaea***	**1**
48	*Shewanella baltica*	1
49	*Stenotrophomonas maltophila*	1
50	*Stenotrophomonas* sp.	1
51	*Yersinia enterocolitica*	4
		Σ=188

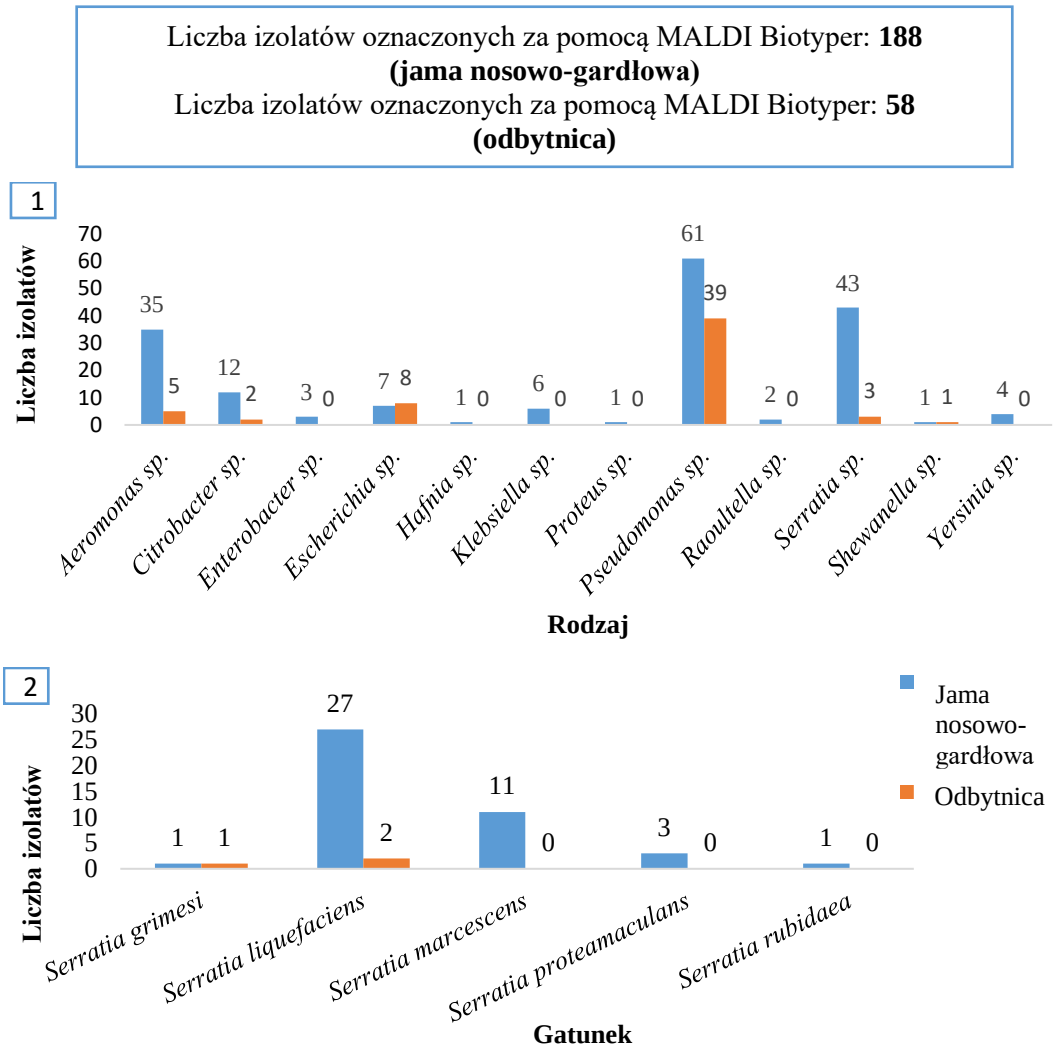
Zastosowanie metody MALDI Biotyper umożliwiło również dokładniejszą identyfikację większości pozyskanych izolatów z odbytnicy. Wyniki tej identyfikacji zostały zaprezentowane w Tab. 19. Zidentyfikowanymi gatunkami analizowanych izolatów są *Citrobacter freundii* (2/58), *Escherichia coli* (7/58) i *Providencia alcalifaciens* (3/58). Z rodzaju *Aeromonas* wyszczególniono dwa gatunki: *A. caviae* (3/58) i *A. media* (2/58), a z rodzaju *Serratia* gatunki ***S. grimesii* (1/58) i *S. liquefaciens* (2/58)**. Najczęściej identyfikowanym rodzajem był rodzaj *Pseudomonas*, w którego skład wchodziły gatunki: *P. antarctica* (1/58), *P. fluorescens* (3/58), *P. fragi* (1/58), *P. fulva* (1/58), *P. gessardii* (8/58), *P. libanensis* (1/58), *P. monteilii* (1/58), *P. proteolytica* (1/58), *P. putida* (2/58), *P. rhodesiae* (2/58), *P. tolaasii* (2/58) i *P. veronii* (1/58). Zastosowana metoda nie pozwoliła na przyporządkowanie wszystkich izolatów do poziomu gatunku. Niketóre izolaty z tej grupy zostały zidentyfikowanie jako rodzaj *Escherichia* (1/58), *Klebsiella* (1/58), *Kluyvera* (1/58), *Providencia* (1/58), *Pseudomonas* (9/58) i *Shewanella* (1/58).

Tabela 19. Wyniki identyfikacji MALDI Biotyper bakterii Gram-ujemnych z odbytnicy świń domowych

Liczba	Lista rodzajów / gatunków izolatów bakteryjnych	Liczba izolatów
1	*Aeromonas caviae*	3
2	*Aeromonas media*	2
3	*Citrobacter freundii*	2
4	*Escherichia coli*	7
5	*Escherichia* sp.	1
6	*Klebsiella* sp.	1
7	*Kluyvera* sp.	1
8	*Providencia alcalifaciens*	3
9	*Providencia* sp.	1
10	*Pseudomonas antarctica*	1
11	*Pseudomonas fluorescens*	3
12	*Pseudomonas fragi*	1
13	*Pseudomonas fulva*	1
14	*Pseudomonas gessardii*	8
15	*Pseudomonas libanensis*	1
16	*Pseudomonas monteilii*	1
17	*Pseudomonas proteolytica*	1
18	*Pseudomonas putida*	2
19	*Pseudomonas rhodesiae*	2
20	*Pseudomonas* sp.	9
21	*Pseudomonas tolaasii*	2
22	*Pseudomonas veronii*	1
23	***Serratia grimesii***	**1**
24	***Serratia liquefaciens***	**2**
25	*Shewanella* sp.	1
		Σ=58

Przedstawiona Ryc. 11 pokazuje porównanie identyfikowanych rodzajów i gatunków bakterii z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy tusz świń domowych. Podobnie jak w przypadku krów domowych, najczęściej identyfikowanymi rodzajami bakterii były rodzaj *Pseudomonas* i *Serratia*. Oprócz tych rodzajów, z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy identyfikowano także rodzaje *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Escherichia* i *Shewanella*. Bakteriami występującymi wyłącznie w jamie nosowo-gardłowej były *Enterobacter* sp., *Hafnia* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Raoultella* sp. oraz *Yersinia* sp.

Rycina 11. Identyfikacja wykonana metodą MALDI Biotyper izolatów jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy świń domowych



Legenda:

1 – wykres przedstawiający rodzaje oznaczonych bakterii, 2 – wykres przedstawiający oznaczone gatunki w obrębie rodzaju *Serratia*

Najczęściej identyfikowanym gatunkiem w obrębie rodzaju *Serratia* był gatunek *S. liquefaciens*. Występował on zarówno w jamie nosowo-gardłowej jak i odbytnicy świń domowych. Dodatkowo w obu badanych miejscach występował gatunek *S. grimesi*. Gatunki *S. marcescens*, *S. proteamaculans* i *S. rubidaea* występowały wyłącznie w jamie nosowo-gardłowej świń domowych.

Podsumowanie

- Zastosowanie podłóż CT/DNASe pozwoliło na skuteczną izolację rodzaju *Serratia* z materiału odzwierzęcego.
- Rodzaj *Serratia* należał do jednego z najczęściej izolowanych rodzajów bakterii Gram-ujemnych pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) i saren europejskich (*Capreolus capreolus*).
- *S.liquefaciens* był najczęściej występującym gatunkiem w obrębie rodzaju *Serratia* u dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) i saren europejskich (*Capreolus capreolus*).
- U dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) gatunek *S. marcescens* występował z mniejszą częstością niż inne gatunki.
- Nie potwierdzono występowania gatunku *S. marcescens* u saren europejskich (*Capreolus capreolus*).
- Bakterie z rodzaju *Serratia* były najczęściej izolowane z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*).
- U krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*) najczęściej identyfikowanym gatunkiem była *S. liquefaciens*, a po nim *S. marcescens*.
- Gatunek *S. liquefaciens* u świń domowych (*Sus scrofa domestica*) występował najczęściej w jamie nosowo-gardłowej.
- U świń domowych (*Sus scrofa domestica*) gatunek *S. marcescens* występował jedynie w jamie nosowo-gardłowej.

13.3. Wyniki detekcji enzymów zewnątrzkomórkowych u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

CEL: Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez detekcję enzymów zewnątrzkomórkowych.

Badanie mające na celu detekcję enzymów zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez pałeczki *S. liquefaciens* i *S. marcescens* zostało przeprowadzone za pomocą metod opisanych w Rozdziale 11.3.

Do badania określającego występowanie enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy wybrano izolaty z najwyższą wartością „score", czyli współczynnika przyrównania widma białek z metody MALDI Biotyper.

Testy biochemiczne sprawdzające obecność enzymu deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy zostały przeprowadzone dla 63 izolatów *S. liquefaciens* i 4 izolatów *S. marcescens* pozyskanych z tusz dzików euroazjatyckich, 14 izolatów *S. liquefaciens* z tusz saren europejskich, 28 izolatów *S. liquefaciens* i 10 izolatów *S. marcescens* pozyskanych z tusz krów domowych oraz 27 izolatów *S. liquefaciens* i 11 izolatów *S. marcescens* pozyskanych z tusz świń domowych (Tab.20).

Tabela 20. Zestawienie pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* badanych w kierunku obecności enzymów zewnątrzkomórkowych

Badane tusze zwierząt	Liczba izolatów oznaczonych za pomocą MALDI Biotyper	Liczba izolatów oznaczonych jako *S. liquefaciens* i *S. marcescens*	Liczba badanych izolatów *S. liquefaciens*	Liczba badanych izolatów *S. marcescens*
Dzik euroazjatycki	421	[a]86	63	4
		[b]5		
Sarna europejska	70	[a]15	14	0
		[b]0		
Krowa domowa	401	[a]32	28	10
		[b]10		
Świnia domowa	246	[a]29	27	11
		[b]11		
	Σ=1138	Σ=188	Σ=132	Σ=25

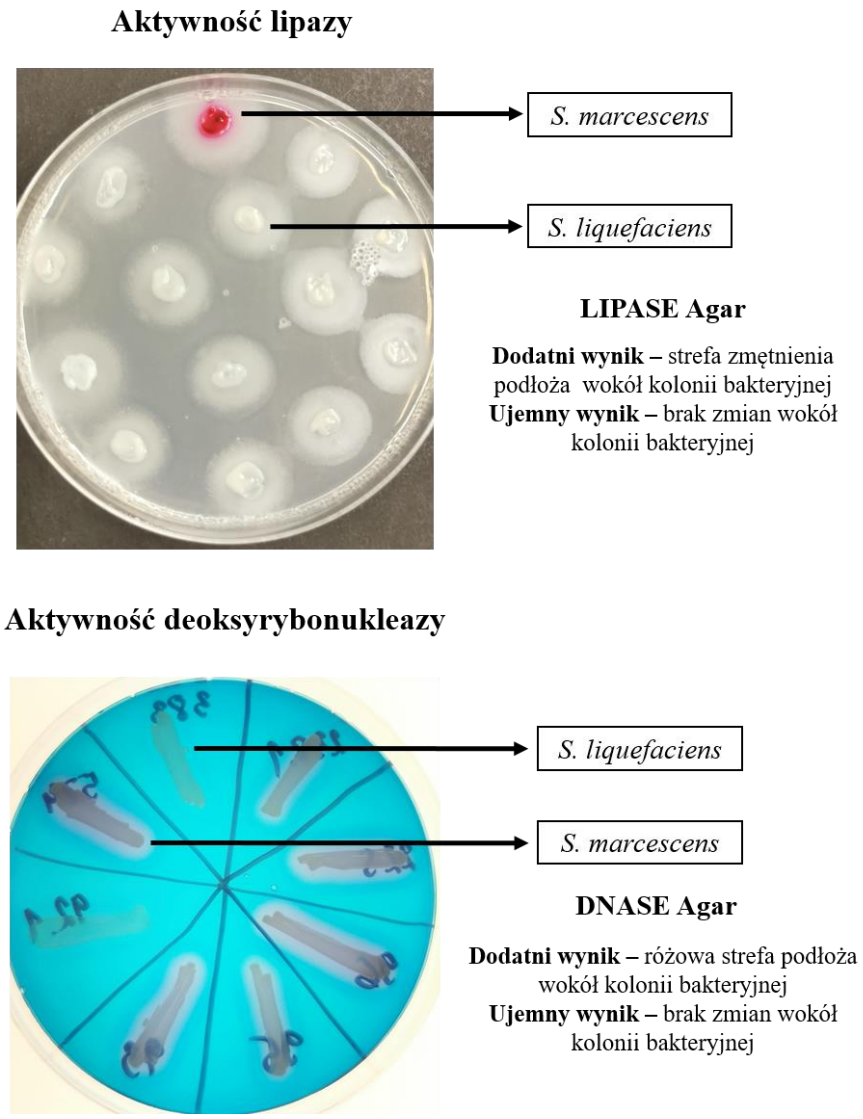
Legenda:

[a] - izolaty oznaczone jako *S. liquefaciens*

[b] - izolaty oznaczone jako *S. marcescens*

Interpretacja wyników testów biochemicznych prowadzonych na podłożach DNAse LAB-AGAR, Lipase LAB-AGAR oraz Gelatinase LAB-AGAR była prowadzona według wskazówek producentów. Wynikiem aktywności enzymu deoksyrybonukleazy było powstanie różowej strefy halo wokół masy bakteryjnej na podłożu DNAse LAB-AGAR. Aktywność enzymu lipazy była interpretowana jako powstanie strefy zmętnienia wokół masy bakteryjnej na podłożu Lipase LAB-AGAR. Z kolei za aktywność enzymu żelatynazy uważano przejaśnienie podłoża Gelatinase LAB-AGAR wokół kolonii bakteryjnych.

Rycina 12. Wyniki badania obecności enzymu lipazy i deoksyrybonukleazy dla wybranych izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens*



Ryc. 12 przedstawia wyniki badania obecności enzymu lipazy i deoksyrybonukleazy dla wybranych izolatów z gatunku *S. marcescens*

i *S. liquefaciens*. Wyniki detekcji enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy dla wszystkich izolatów *S. liquefaciens* przedstawiono w Tab. 21.

Tabela 21. Wyniki detekcji enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy dla *S. liquefaciens* oraz *S. marcescens*

Badane enzymy	***S. liquefaciens***			
	Dziki euroazjatyckie (*Sus scrofa*)	Sarny europejskie (*Capreolus capreolus*)	Krowy domowe (*Bos taurus taurus*)	Świnie domowe (*Sus scrofa domestica*)
DNASE	95% (60/63)	85% (12/14)	87% (28/32)	100% (27/27)
LIP	100% (63/63)	100% (14/14)	97% (31/32)	100% (27/27)
GEL	100% (63/63)	100% (14/14)	94% (30/32)	100% (27/27)
Badane enzymy	***S. marcescens***			
	Dziki euroazjatyckie (*Sus scrofa*)	Sarny europejskie (*Capreolus capreolus*)	Krowy domowe (*Bos taurus taurus*)	Świnie domowe (*Sus scrofa domestica*)
DNASE	100% (4/4)	Brak izolatów *S. marcescens* od saren europejskich	100% (10/10)	100% (11/11)
LIP	100% (4/4)		100% (10/10)	100% (11/11)
GEL	100% (4/4)		100% (10/10)	100% (11/11)

Legenda:
DNASE - deoksyrybonukleaza, **LIP**- lipaza, **GEL** - żelatynaza

Zaprezentowane wyniki w Tab. 21 pokazują zróżnicowane występowanie enzymów zewnątrzkomórkowych u testowanych *S. liquefaciens*. Wszystkie bakterie pozyskane z tusz dzików euroazjatyckich oraz z tusz saren europejskich posiadały enzymy lipazę oraz żelatynazę. Wśród *S. liquefaciens* wyizolowanej od dzików euroazjatyckich enzym deoksyrybonukleazę wykrywano u 60/63 izolatów, natomiast brak występowania tego enzymu stwierdzono dla 3/63 izolatów. Z kolei w przypadku *S. liquefaciens* pozyskanej od saren europejskich obecność tego enzymu wykazywało 12/14 izolatów, a 2/14 izolatów nie miało enzymu deoksyrybonukleazy.

S. liquefaciens pozyskane z tusz krów domowych wykazują zdecydowanie odmienne wyniki obecności badanych enzymów niż te występujące u dzików euroazjatyckich i saren europejskich. Wśród 32 przebadanych *S. liquefaciens* enzym deoksyrybonukleazę posiadało 28 izolatów. Enzym lipaza występował u zdecydowanej większości izolatów (31/32). Z kolei enzymu żelatynazy nie potwierdzono jedynie u 2/32 pałeczek *S. liquefaciens.*

Największą częstość występowania badanych enzymów zewnątrz-komórkowych stwierdzono u *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz świń domowych.

Wszystkie 27 przebadanych izolatów posiadały enzym deoksyrybonukleazę, lipazę oraz żelatynazę.

W odróżnieniu od wcześniej opisanych *S. liquefaciens*, pałeczki *S. marcescens* posiadają wszystkie badane enzymy zewnątrzkomórkowe. Wyniki te dotyczą zarówno izolatów pozyskanych od dzików euroazjatyckich, krów domowych i świń domowych.

Podsumowanie

- Większość bakterii z gatunku *S. liquefaciens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*) posiadały enzymy deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy.
- U *S. liquefaciens* pozyskanych od świń domowych (*Sus scrofa domestica*) wykazano największą częstość występowania deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy w stosunku do pozostałych izolatów.
- Zróżnicowaną obecność deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy stwierdzono u *S. liquefaciens* pozyskanych od krów domowych (*Bos taurus taurus*).
- Zarówno u *S. liquefaciens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) jak i saren europejskich (*Capreolus capreolus*) stwierdzono obecność enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy.
- U wszystkich pałeczek *S. marcescens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*) enzymy deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy występowały z tą samą częstością.

13.4. Wyniki detekcji enzymu hemolizyny u *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

Badanie występowania enzymu hemolizyny u pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* przeprowadzono na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (bioMérieux). Zdolność bakterii do rozkładu czerwonych krwinek interpretowane było jako przejaśnienie podłoża wokół kolonii bakteryjnych, co również opisano w rozdziale 11.4. Celem przeprowadzenia tego badania było

sprawdzenie zdolności odzwierzęcych pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* do rozkładu czerwonych krwinek.

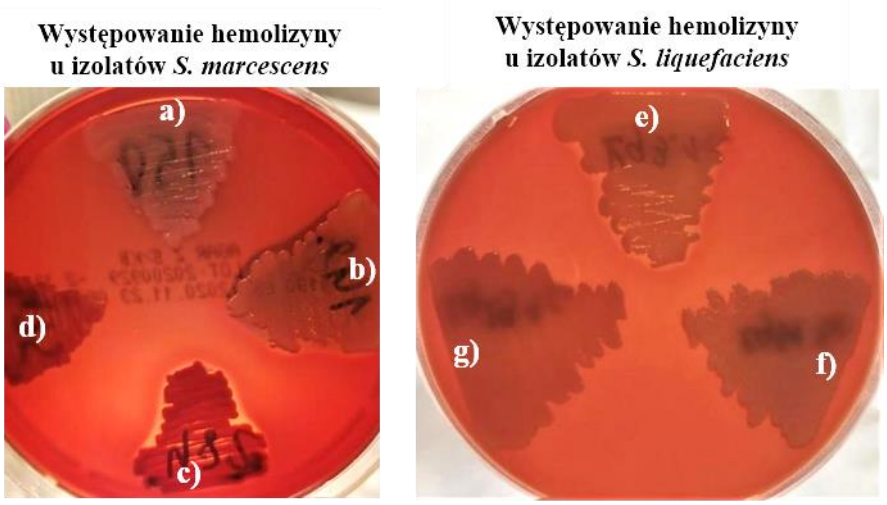
Test sprawdzający występowanie hemolizyny przeprowadzono dla 63 izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz dzików euroazjatyckich, 14 izolatów z tusz saren europejskich, 32 izolatów z tusz krów domowych oraz 27 izolatów z tusz świń domowych. Test występowania hemolizyny przeprowadzono również dla 4 izolatów *S. marce-scens* od dzików euroazjatyckich, 13 izolatów od krów domowych oraz 11 izolatów od świń domowych. **Do badania wybrano wszystkie izolaty testowane w kierunku obecności enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy.**

W przebiegu doświadczenia wykazano, że występowanie enzymu hemolizyny u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* utrzymywało się na zróżnicowanym poziomie, co przedstawiono w Tab. 22. Spośród wszystkich izolatów *S. liquefaciens,* najczęściej hemolizyna występowała u izolatów pozyskanych od świń domowych (25%; 7/27). Natomiast niewiele rzadziej hemolizyna występowała u izolatów z tusz dzików euroazjatyckich (22%; 14/63) oraz z tusz saren europejskich (3/14; 21%). Dla testowanych izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz krów domowych obecność enzymu hemolizyny potwierdzono dla 3 izolatów (3/32; 9%). Wśród izolatów *S. marcescens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich występowanie hemolizyny potwierdzano dla 3 izolatów (75%; 3/4). Z kolei obecność enzymu hemolizyny u izolatów pozyskanych z tusz krów domowych i świń domowych określono na poziomie 15% (2/13) oraz 18% (1/11).

Tabela 22. Częstość występowania hemolizyny u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

Gatunek	Źródło izolacji	Aktywność hemolityczna
S.liquefaciens	Dzik euroazjatycki	22% (14/63)
	Sarna europejska	21% (3/14)
	Krowa domowa	9% (3/32)
	Świnia domowa	25% (7/27)
S.marcescens	Dzik euroazjatycki	75% (3/4)
	Krowa domowa	15% (2/13)
	Świnia domowa	18% (1/11)

Rycina 13. Wyniki występowania hemolizyny u izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens*



Legenda:
a), **d)** izolat *S. marcescens* nie wytwarzający enzymu hemolizyny; **b)**, **c)** izolat *S. marcescens* wytwarzający enzym hemolizynę; **e)** izolat *S. liquefaciens* wytwarzający enzym hemolizynę; **f)**, **g)** izolat *S. liquefaciens* nie wytwarzający enzym hemolizyny

Na Ryc. 13 przedstawiono przykładowe wyniki badania występowania hemolizyny u wybranych 4 izolatów *S. marcescens* oraz 3 izolatów *S. liquefaciens*. Izolaty przedstawione na rycinie prezentują przykład obrazu, na podłożu Columbia Agar, rozkładu czerwonych krwinek (występowanie hemolizyny) oraz braku zmian w podłożu (brak hemolizyny).

Podsumowanie

- W obrębie gatunku *S. liquefaciens* najczęściej enzym hemolizyny występował u izolatów pozyskanych od świń domowych (*Sus scrofa domestica*), a najrzadziej u izolatów od krów domowych (*Bos taurus taurus*).
- W obrębie gatunku *S. marcescens* najczęściej enzym hemolizyny występował u izolatów pozyskanych od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), a najrzadziej u izolatów pozyskanych od krów domowych (*Bos taurus taurus*).

13.5. Wyniki detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

CEL: Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez detekcję wybranych genów wirulencji.

Detekcję obecności wybranych genów wirulencji (*fimA*, *phlA*, *phlB*, *shlA* i *shlB*) prowadzono z wykorzystaniem techniki PCR.

fimA – gen kodujący fimbrie typu I
phlA, phlB – geny kodujące białka fosfolipazy A
shlA, shlB – geny kodujące białka ShlA i ShlB toksyny hemolitycznej

Badane geny wirulencji były wizualizowane za pomocą elektroforezy agarozowej jako produkty o określonej wielkości. Geny wirulencji badane u izolatów *S. liquefaciens* miały następujące wielkości: *fimA* - 514 pz, *phlA* - 439 pz, *phlB* - 741 pz, *shlA* - 4722 pz i *shlB* - 1553 pz. Natomiast geny wirulencji badane u *S. marcescens* miały produkty o wielkości 514 pz dla genu *fimA*, 917 pz dla genu *phlA*, 641 pz dla genu *phlB*, 1559 pz dla genu *shlA* oraz 1648 pz dla genu *shlB*.

Do badania określającego obecność wybranych genów wirulencji u przedstawicieli *S. marcescens* i *S. liquefaciens* wybrano izolaty z potwierdzonymi enzymami deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy, co przedstawiono w Tab. 23.

Tabela 23. Zestawienie izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* badanych w kierunku występowania wybranych genów wirulencji

	Liczba badanych izolatów w kierunku obecności enzymów zewnątrzkomórkowych		**Liczba badanych izolatów w kierunku obecności wybranych genów wirulencji**	
Badane zwierzę	*S. liquefaciens*	*S. marcescens*	*S. liquefaciens*	*S. marcescens*
Dzik euroazjatycki	63	4	39	4
Sarna europejska	14	0	13	0
Krowa domowa	28	10	21	5
Świnia domowa	27	11	26	11
	Σ=132	Σ=25	Σ=99	Σ=20

Badanie występowania genów *fimA, phlA, phlB, shlA* i *shlB* przeprowadzono dla 39 izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz dzików euroazjatyckich (Tab. 23). Gen kodujący fimbrie typu I posiada 36/39 (92%) izolatów. U 3/39 izolatów poszukiwany gen nie występuje. Detekcja genów *phlA* i *phlA* kodujących białka fosfolipazy A wykazuje, że 18/39 (46%) izolatów posiada gen *phlA* oraz 38/39 (97%) izolatów posiada gen *phlB*. Z kolei badanie obecności genów *shlA* i *shlB* kodujących białka toksyny hemolitycznej wykazuje, że gen *shlA* występuje u 35/39 (89%) izolatów, a gen *shlB* występuje u 2/39 (5%) izolatów (Tab. 24).

W celu badania występowania wybranych genów wirulencji analizę przeprowadzono również dla 13 izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz saren europejskich (Tab. 23). Gen *fimA* potwierdzono dla 12/13 (92%) izolatów. Obecność genów *phlA* i *phlB* wykazano u 13/13 (100%) izolatów. Z kolei częstość występowania genów *shlA* i *shlB* wynosi odpowiednio 12/13 (92%) izolatów oraz 4/13 (31%) izolatów (Tab. 24).

Detekcję genów wirulencji przeprowadzono również dla 21 izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz krów domowych (Tab. 23). Wyniki tej detekcji pokazują, że gen *fimA* występuje u 18/21 (85%) izolatów. Geny *phlA* i *phlB* występują u 19/21 (90%) oraz 21/21 (100%) izolatów. Gen *shlA* występuje u 7/21 (33%) izolatów, natomiast występowania genu *shlB* nie stwierdzono (Tab. 24).

Identyfikację genów *fimA, shlA, shlB* oraz *phlA* i *phlB* przeprowadzono dla 26 izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz świń domowych (Tab. 23). Wszystkie badane izolaty posiadają gen *fimA* oraz *phlA*. Obecność genu *phlB* stwierdzono u 25/26 (96%) izolatów, natomiast występowanie genu *shlA* potwierdzono u 21/26 (81%) izolatów. Gen *shlB* występował jedynie u 2/26 (8%) izolatów *S. liquefaciens* (Tab. 24).

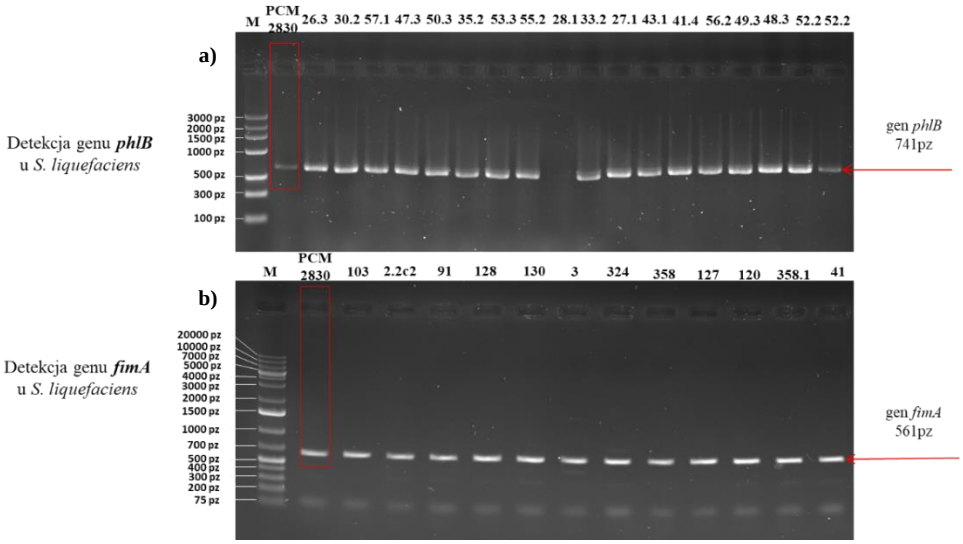
Izolaty *S. marcescens* pozyskane z tusz dzików euroazjatyckich, saren europejskich oraz krów i świń domowych również testowane były w kierunku obecności genów *fimA, shlA* i *shlB* oraz *phlA* i *phlB* (Tab. 24). Wszystkie izolaty *S. marcescens* pozyskane od dzików posiadają geny *fimA* i *phlA*. Geny *phlB* i *shlA* występują u 1/4 (25%) izolatów oraz u 2/4 (50%) izolatów. Gen *shlB* nie został zidentyfikowany wśród izolatów *S. marcescens* pozyskanych od dzików euro-azjatyckich. Wśród 5 izolatów *S. marcescens* wyizolowanych od krów domowych wszystkie posiadają geny *fimA* i *phlA*. Dla 4/5 (80%) izolatów stwierdzono obecność genu *phlB* i *shlA*. Natomiast występowanie genu *shlB* udowodniono dla 1/5 (20%) izolatu. Izolaty *S. marcescens* wyizolowane od świń domowych w zdecydowanej większości nie posiadają genu *fimA* kodującego fimbrie typu I. Gen ten stwierdzono wyłącznie u 1/11 (9%) izolatów. Izolaty wyizolowane od świń w większości posiadają gen *phlA* (10/11; 90%) oraz gen *phlB* (9/11; 81%). Natomiast dla genów *shlA* i *shlB* stwierdzono 100% prewalencji.

Tabela 24. Wyniki detekcji wybranych genów wirulencji izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

Gatunek bakterii	Gen kodujący czynnik wirulencji	Źródło izolacji pałeczek *Serratia* sp.			
		Dziki euroazjatyckie (*Sus scrofa*)	Sarny europejskie (*Capreolus capreolus*)	Krowy domowe (*Bos taurus taurus*)	Świnie domowe (*Sus scrofa domestica*)
Serratia liquefaciens	*fimA*	92,00% (36/39)	92,00% (12/13)	85,00% (18/21)	100% (26/26)
	phlA	46,00% (18/39)	100% (13/13)	90,00% (19/21)	100% (26/26)
	phlB	97,00% (38/39)	100% (13/13)	100% (21/21)	96,00% (25/26)
	shlA	89,00% (35/39)	92,00% (12/13)	33,00% (7/21)	81,00% (21/26)
	shlB	5,00% (2/39)	31,00% (4/13)	0% (0/21)	8,00% (2/26)
Serratia marcescens	*fimA*	100% (4/4)	Brak izolacji *S. marcescens* od saren europejskich	100% (5/5)	9,00% (1/11)
	phlA	100% (4/4)		100% (5/5)	90,00% (10/11)
	phlB	25,00% (1/4)		80,00% (3/5)	81,00% (9/11)
	shlA	50,00% (2/4)		80,00% (3/5)	100% (11/11)
	shlB	0% (0/4)		20,00% (1/5)	100% (11/11)

Legenda:
fimA **–** gen kodujący fimbrie typu I, ***phlA*, *phlB*** – geny kodujące białka fosfolipazy A, ***shlA***, ***shlB*** – geny kodujące białka ShlA, ShlB toksyny hemolitycznej

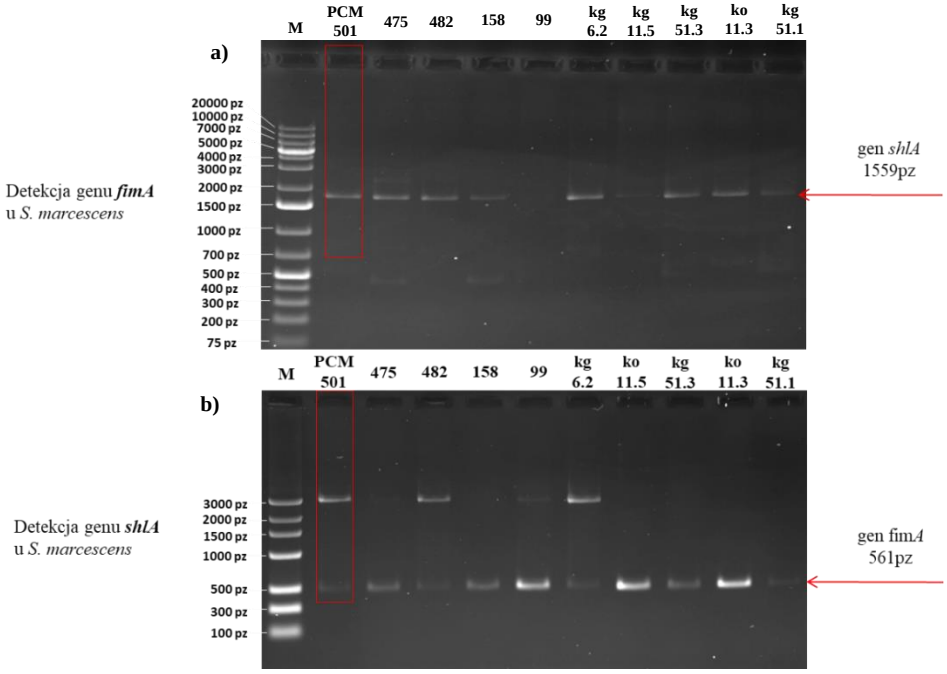
Rycina 14. Przykładowy obraz detekcji genów *phlB* i *fimA* u *S. liquefaciens*



Legenda:

a) M – marker masy DNA Marker 3 (A&A Biotechnology); PCM 2830 – szczep *S. liquefaciens* z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów; 26.3 – 52.2 - izolaty *S. liquefaciens* pozyskane od świń domowych **b)** M – marker masy GeneRuller (ThermoFisher Scientific); 103, 91, 128, 130, 324, 358, 127, 120, 358.1 – izolaty *S. liquefaciens* pozyskane od dzików euroazjatyckich; 3 – izolat *S. liquefaciens* pozyskany od sarny europejskiej; 41 – izolat *S. liquefaciens* pozyskany od świni domowej

Rycina 15. Przykładowy obraz detekcji genów *shlA* i *fimA* u *S. marcescens*



Legenda:

M – marker masy DNA Marker 3 (A&A Biotechnology) **(a)**; M – marker masy GeneRulller (ThermoFisher Scientific) **(b)**; PCM 501 – szczep *S. marcescens* pozyskany z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów; 475, 482, 158, 99 – izolaty *S. marcescens* pozyskane od dzików euroazjatyckich; kg6.2, ko11.5, kg51.3, ko11.3, kg51.1 – izolaty *S. marcescens* pozyskane od krów domowych

Na Ryc. 14 i Ryc. 15 przedstawiono przykładowe zdjęcia elektroforezy agarozowej przedstawiające wyniki detekcji genów *phlB* i *fimA* dla wybranych izolatów *S. liquefaciens* oraz genów *shlA* i *fimA* dla wybranych izolatów *S. marcescens*.

Na podstawie uzyskanych wyników detekcji genów *fimA, phlA/phlB* oraz *shlA/shlB* stworzono profile genetyczne będące podstawą selekcji izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* do kolejnych badań dotyczących oceny długości łańcucha O-swoistego LPS, ważnego czynnika branego pod uwagę w odniesieniu do wirulencji szczepów, w szczególności w testach oporności na surowicę. Do badania preparatów LPS użyto izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* o określonym profilu genów wirulencji wskazujących na potencjalny zwiększony poziom wirulencji badanych izolatów. Opracowane profile genetyczne przedstawiono w Tab. 25 i Tab. 26. Profil, do którego zaliczono najwięcej izolatów został zaznaczony pogrubioną czcionką.

Tabela 25. Profile genów wirulencji izolatów *S. liquefaciens*

Lp.	Profil genów wirulencji	Potencjał wirulencji	Liczba izolatów
1	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA+/shlB-*	fimbrie	20
2	***fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-***	**fimbrie, fosfolipaza A**	**43**
3	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	fimbrie, fosfolipaza A	14
4	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA+/shlB+*	fimbrie, toksyna hemolityczna shlA	3
5	*fimA-/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-*	fosfolipaza A	3
6	*fimA-/phlA-/phlB-/shlA-/shlB-*	brak czynników wirulencji	1
7	*fimA-/phlA-/phlB+/shlA-/shlB-*	brak czynników wirulencji	1
8	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB+*	fimbrie, toksyna hemolityczna shlA, fosfolipaza A	2
9	*fimA-/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	fosfolipaza A	2
10	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA-/shlB-*	fimbrie	1
11	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA-/shlB-*	fimbrie	1
			Σ=91

Przedstawione w Tab. 25 profile genów wirulencji wskazują na obecność poszukiwanych genów wirulencji wśród izolatów *S. liquefaciens*. Najczęściej występuje profil, w którym występują szczepy posiadające geny kodujące zarówno fimbrie typu I jak i zestaw dwóch genów związanych z fosfolipazą A. Pozostałe zaprezentowane profile pokazują, że *S. liquefaciens* posiadają wyłącznie fimbrie typu I albo fosfolipazę A. Występują również profile wskazujące na obecność dwóch czynników wirulencji - fimbrii i toksyny hemolitycznej shlA. W obrębie badanego gatunku występowały również pałeczki posiadające wszystkie badane czynniki wirulencji, czyli fimbrie typu I, toksynę hemolityczną shlA oraz fosfolipazę A.

W badaniu stwierdzono również występowanie pałeczek nieposiadających genów wirulencji *fimA*, *shlA*, *shlB*, *phlA* oraz *phlB*.

Tabela 26. Profile genów wirulencji izolatów *S. marcescens*

Lp.	Profil genów wirulencji	Potencjał wirulencji	Liczba izolatów
1	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-*	fimbrie, fosfolipaza A	2
2	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	fimbrie, fosfolipaza A	1
3	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	fimbrie, toksyna hemolityczna shlA	1
4	***fimA-/phlA-/phlB-/shlA-/shlB-***	**brak czynników wirulencji**	**7**
5	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA+/shlB-*	fimbrie	2
6	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA-/shlB-*	fimbrie	2
7	*fimA-/phlA+/phlB-/shlA+/shlB+*	toksyna hemolityczna shlA	2
			Σ=17

Tab. 26 pokazuje profile genów wirulencji wyszczególnione dla pałeczek z gatunku *S. marcescens*. Zdecydowana ich większość należała do profilu oznaczonego jako: brak badanych czynników wirulencji. Jednakże odnotowano występowanie *S. marcescens*, które posiadały zestaw genów dla fimbrii typu I i fosfolipazy A, fimbrii typu I i toksyny hemolitycznej shlA oraz tylko fimbrii typu I i toksyny hemolitycznej shlA.

Podsumowanie

- Największy odsetek badanych genów wirulencji wśród *S. liquefaciens* mają izolaty pozyskane od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*), a najmniejszy odsetek mają izolaty od krów domowych (*Bos taurus taurus*).
- Największy odsetek badanych genów wirulencji wśród *S. marcescens* mają izolaty od krów domowych (*Bos taurus taurus*), a najmniejszy odsetek izolaty od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*).
- *S. marcescens* pozyskane od świń domowych (*Sus scrofa domestica*) miały najmniejszy odsetek występowania genu kodującego fimbrie typu I w stosunku do wszystkich badanych izolatów.
- Klasyfikacja szczepów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* wykazała również, że wśród testowanych pałeczek występowały izolaty nie posiadające żadnych z testowanych genów wirulencji.

13.6. Charakterystyka długości O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

CEL: Określenie długości O-swoistego łańcucha LPS wśród izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* pozyskanych od zwierząt gospodarskich i wolno żyjących.

Charakterystykę długości O-swoistego łańcucha LPS przeprowadzono dla 33 izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* wyselekcjonowanych na podstawie stworzonych profili genów wirulencji przedstawionych w Tab. 26 oraz w Tab. 27. Wśród testowanych 33 izolatów, 25 należało do gatunku *S. liquefaciens*, a 8 należało do gatunku *S. marcescens*. Do badania wybrano 11 izolatów *S. liquefaciens* oraz 3 izolaty *S. marcescens* wyizolowane od dzików euroazjatyckich. Od saren europejskich wybrano 5 izolatów *S. liquefaciens*. Charakterystykę długości O-swoistego łańcucha LPS przeprowadzono również dla 5 izolatów *S. liquefaciens* i 2 izolatów *S. marcescens* wyizolowanych od krów domowych oraz 4 izolatów *S. liquefaciens* i 3 izolatów *S. marcescens* pozyskanych od świń domowych. **Do określenia długości O-swoistego łańcucha LPS wybrano izolaty *S. liquefaciens* i *S. marcescens* zaklasyfikowane do podanych w Tab. 27 oraz w Tab. 28 profili genów wirulencji. Przy wyborze izolatów uwzględniono izolaty pozyskane od wszystkich zwierząt gospodarskich oraz wolno żyjących. W przypadku braku występowania w obrębie danego profilu izolatów od różnych zwierząt do badania wyselekcjonowano izolaty od jednego zwierzęcia.**

Tabela 27. Zestawienie puli izolatów *S. liquefaciens* charakteryzowanych pod kątem długości O-swoistego łańcucha LPS

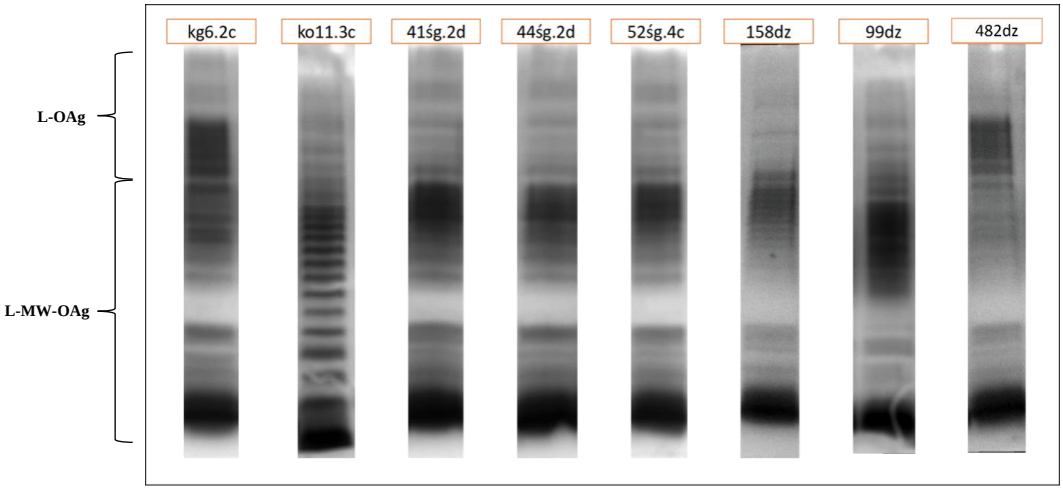
Liczba	Profil genów wirulencji	Liczba izolatów	Liczba wybranych izolatów do oznaczenia LPS	Oznaczenia izolatów
1	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA+/shlB-*	20	3	139dz, 129dz, 428dz
2	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-*	43	8	92dz.1, 10s, 22s, kg17.2c, 47śg.3d, 130dz, 128dz, 3s
3	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	14	3	201dz, kg41.1d, 43śg.1c
4	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA+/shlB+*	3	2	97dz, 5s
5	*fimA-/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-*	3	3	123dz, 44s, kg40.1d
6	*fimA-/phlA-/phlB-/shlA-/shlB-*	1	1	138dz
7	*fimA-/phlA-/phlB+/shlA-/shlB-*	1	1	422dz
8	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB+*	2	1	51śg.2c
9	*fimA-/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	2	1	kg49.1c
10	*fimA+/phlA-/phlB+/shlA-/shlB-*	1	1	kg53.3d
11	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA-/shlB-*	1	1	55śg.2c
		Σ=91	Σ=25	

Tabela 28. Zestawienie puli izolatów *S. marcescens* charakteryzowanych ze względu na długość O-swoistego łańcucha LPS

Liczba	Profil genów wirulencji	Liczba izolatów	Liczba wybranych izolatów do oznaczenia LPS	Oznaczenia izolatów
1	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA+/shlB-*	2	2	kg6.2c, ko11.3c
2	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	1	1	99dz
3	*fimA+/phlA+/phlB+/shlA-/shlB-*	1	1	52śg.4c
4	*fimA-/phlA-/phlB-/shlA-/shlB-*	7	1	44śg.2d
5	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA+/shlB-*	2	1	482dz
6	*fimA+/phlA+/phlB-/shlA-/shlB-*	2	1	158dz
7	*fimA-/phlA+/phlB-/shlA+/shlB+*	2	1	41śg.3c
		Σ=17	Σ=8	

Na podstawie przeprowadzonej wizualizacji długości cząsteczki LPS stwierdzono występowanie frakcji LPS-u z długim O-swoistym łańcuchem zbudowanym z wielu powtarzających się podjednostek (typu L-OAg) u wszystkich badanych izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*.

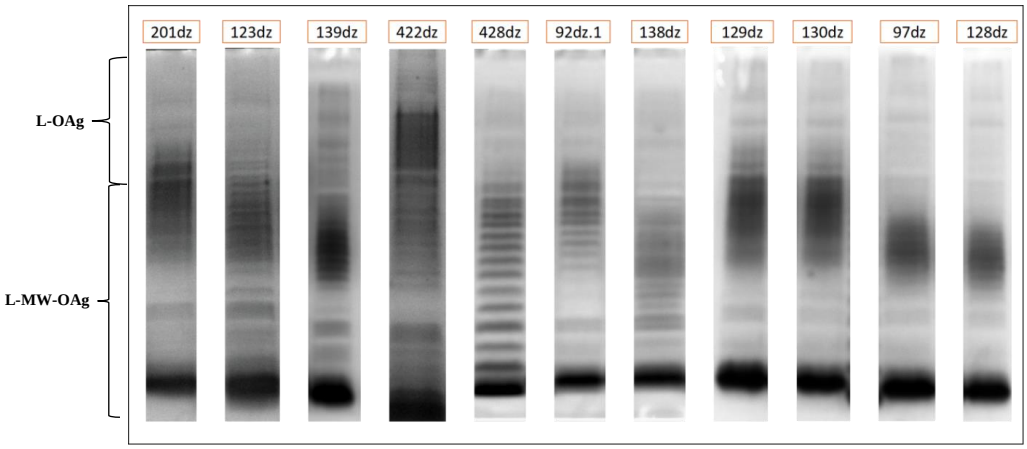
Rycina 16. Obraz elektroforezy SDS-PAGE długości O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. marcescens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich oraz krów i świń domowych



Legenda:
kg6.2c, ko11.3c – izolaty *S. marcescens* pozyskane od krów domowych; 41śg.2d, 44śg.2d, 52śg.4c – izolaty *S. marcescens* pozyskane od świń domowych; 158dz, 99dz, 158dz – izolaty *S. marcescens* pozyskane od dzików euroazjatyckich

Przedstawiona Ryc. 16 pokazuje, że w obrębie izolatów *S. marcescens* pozyskanych od świń domowych (41śg.2d, 44śg.2d, 52śg.4c) istnieje pewne podobieństwo profili rozmieszczenia podjednostek w O-swoistych łańcuchach LPS. Natomiast obraz podjednostek O-swoistego łańcucha LPS uzyskany dla izolatów *S. marcescens* wyizolowanych od krów domowych (kg6.2c, ko11.3c) i dzików euroazjatyckich (158dz, 99dz, 158dz) jest zróżnicowany.

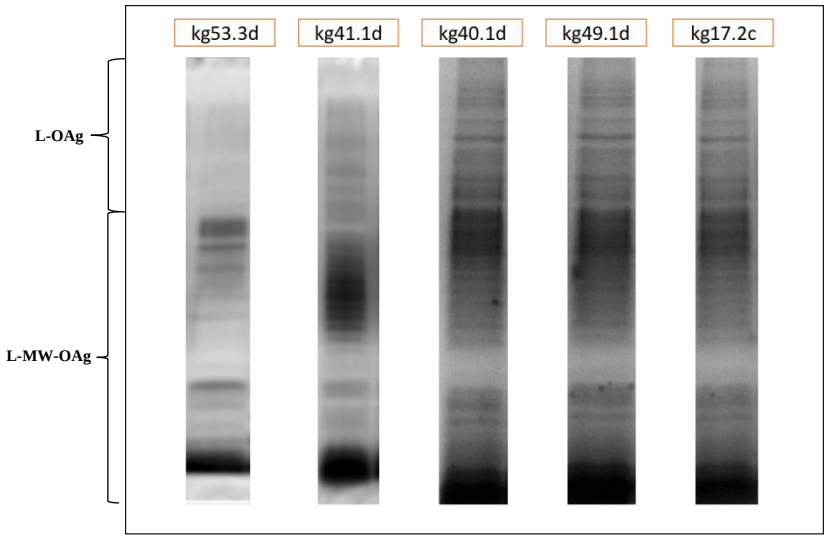
Rycina 17. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* wyizolowanych od dzików euroazjatyckich



Legenda:
201dz, 123dz, 139dz, 422dz, 428dz, 92dz.1, 138dz, 129dz, 130dz, 97dz, 128dz – izolaty *S. liquefaciens* pozyskany od dzików euroazjatyckich

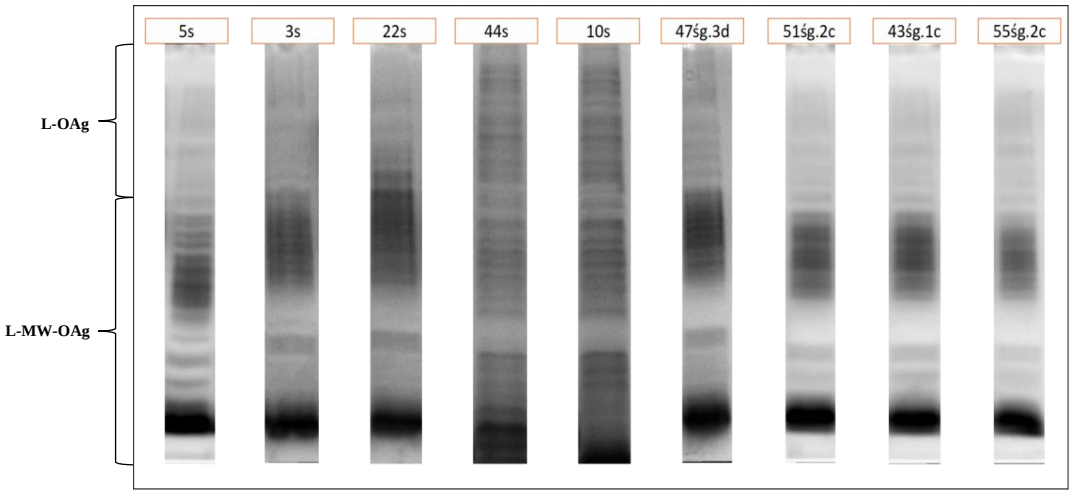
Duża różnorodność profili rozmieszczenia podjednostek O-swoistego łańcucha LPS została zaobserwowana u izolatów *S. liquefaciens* wyizolowanych od dzików euroazjatyckich, co również przedstawiono na Ryc. 17. Jednakże podobieństwa w uzyskanym obrazie zaobserwowano dla izolatów 129dz i 130dz oraz dla izolatów 97dz i 128dz.

Rycina 18. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* wyizolowanych od krów domowych



Legenda:
kg53.3d, kg41.1d, kg40.1d, kg49.1d, kg17.2 – izolaty *S. liquefaciens* pozyskane od krów domowych

Rycina 19. Obraz elektroforezy SDS-PAGE O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych od saren europejskich i świń domowych



Legenda:
5s, 3s, 22s, 44s, 10s – izolaty *S. liquefaciens* pozyskane od saren europejskich; 47śg.3d, 51śg.2c, 43śg.1c, 55śg.2c – izolaty *S. liquefaciens* pozyskane od świni domowych

Rycina 18 i 19 wskazuje na kolejne zróżnicowania profili rozmieszczenia podjednostek O-swoistego łańcucha LPS wśród izolatów *S. liquefaciens*. Wśród izolatów pozyskanych od krów domowych podobieństwo zaobserwowano dla kg40.1d, kg49.1d oraz kg17.2c (Ryc. 18). Z kolei na Ryc. 19 pokazano podobieństwo rozmieszczenia podjednostek O-swoistego łańcucha LPS dla wszystkich izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych od świń domowych. Pewne podobieństwa zaobserwowano również dla izolatów 44s i 10s pozyskanych od saren europejskich. Pozostałe izolaty *S. liquefaciens* posiadały zróżnicowany obraz O-swoistego łańcucha LPS.

Podsumowanie

- U wszystkich badanych izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* zaobserwowano rozkład modalny zawierający dwie frakcje: L-OAg i LMW-OAg.
- Podobieństwa rozmieszczenia podjednostek O-swoistego łańcucha LPS zaobserwowano dla izolatów *S. marcescens* od świń domowych (*Sus scrofa domestica*).
- Izolaty *S. marcescens* od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) i krów domowych (*Bos taurus taurus*) wykazywały różnorodność długości podjednostek O-swoistego łańcucha LPS.
- Izolaty *S. liquefaciens* od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*) posiadały pewne podobieństwa w rozkładzie podjednostek O-swoistego łańcucha LPS.

13.7. Wyniki analizy wrażliwości *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakterio-bójcze działanie surowicy

CEL: Określenie stopnia przeżywalności izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w ludzkiej surowicy (NHS).

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki długości O-swoistego łańcucha LPS do analizy wybrano łącznie 10 izolatów *S. liquefaciens* i *S.marcescens* do testów wrażliwości na działanie ludzkiej surowicy. Dodatkowym kryterium wyboru było źródło izolacji badanych izolatów. Z gatunku *S. liquefaciens* wybrano 1 izolat z tuszy sarny europejskiej, 1 izolat z tuszy krowy domowej oraz 4 izolaty z tusz dzików euroazjatyckich. Natomiast z gatunku *S. marcescens* wyłoniono 2 izolaty z tusz krów domowych oraz 2 izolaty z tuszy świni domowej (Tab.29).

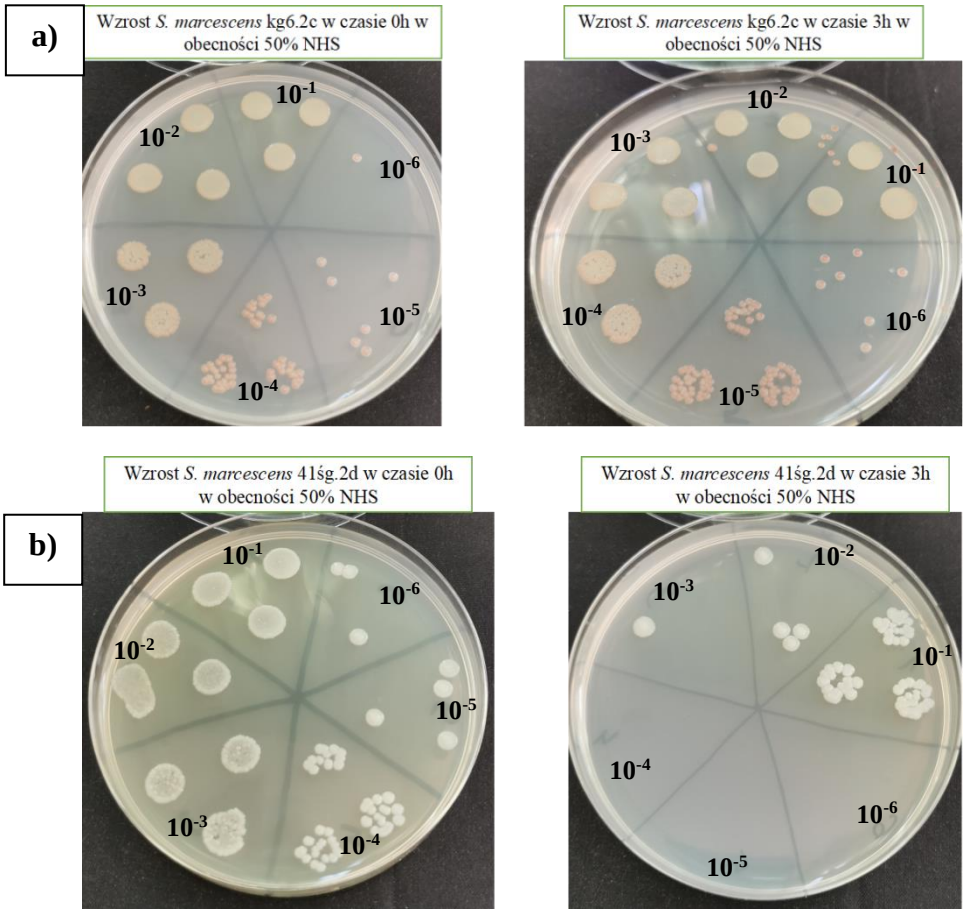
Tabela 29. Zestawienie izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* wybranych do badania przeżywalności w 50% aktywnej NHS

Liczba	Gatunek bakterii	Izolaty wybrane do oznaczenia LPS	Izolaty wybrane do badania przeżywalności w NHS	Liczba izolatów
1	*S. liquefaciens*	201dz, 123dz, 139dz, 422dz, 428dz, 92dz.1, 138dz, 129dz, 130dz, 97dz, 128dz, kg53.3d, kg41.1d, kg40.1d, kg49.1d, kg17.2c, 5s, 3s, 22s, 44s, 10s, 47śg.3d, 51śg.2c, 43śg.1c, 55śg.2c	kg40.1d, 97dz, 3s, 120dz, 139dz, 130dz	6
2	*S. marcescens*	kg6.2c, ko11.3c, 41śg.2d, 44śg.2d, 52śg.4c, 158dz, 99dz, 482dz	ko11.5d, 41śg.2d, 52śg.4c, kg6.2c	4
				Σ=10

Analizę przeżywalności izolatów *S. liquefaciens* oraz *S. marcescens* przeprowadzono celem zbadania potencjalnych korelacji pomiędzy długością O-swoistego łańcucha LPS, a opornością na działanie ludzkiej surowicy. Dodatkowo, badanie to przeprowadzono celem wykazania oporności lub też wrażliwości izolatów *Serratia* sp. pozyskanych od zwierząt w kontekście opisywanych przypadków w literaturze zdolności wywoływania sepsy, co zostało opisane w Rozdziale 3.

Badanie działania bakteriobójczego normalnej surowicy ludzkiej (NHS) wykonano zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 11.7. Hodowlę płynną badanego szczepu o ustalonej gęstości OD_{600}=0,3 zmieszano w równej objętości z roztworem komercyjnej surowicy ludzkiej (Sigma-Aldrich), prowadząc tym do uzyskania 50% roztworu surowicy. W ustalonych czasach pobierano 50µl hodowli i wykonano szereg rozcieńczeń do rozcieńczenia 10^7. Następnie z każdego rozcieńczenia wysiewano objętość 10µl metodą nakropień i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Wyniki przykładowej analizy przeżywalności szczepu *S. marcescens* pozyskanego od krowy domowej (kg6.2c) oraz szczepu pozyskanego od świni domowej (41śg.2d) przedstawiono na Ryc. 20.

Rycina 20. Przykładowy wynik eksperymentu analizy wzrostu bakterii przy 50% NHS dla szczepu opornego (kg6.2c) i wrażliwego (41śg.2d) *S. marcescens*



Legenda:

10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} – kolejne rozcieńczenia hodowli badanego szczepu *S. marcescens* z roztworem ludzkiej surowicy wysiane na powierzchnię płytki agarowej

Rycina 20 przedstawia przykład przeprowadzania analizy przeżywalności badanych izolatów *S. marcescens* w obecności aktywnej 50% surowicy ludzkiej. Jak obrazuje to Ryc. 21a *S. marcescens* kg6.2c, w porównaniu do czasu rozpoczęcia eksperymentu, zwiększyła liczebność komórek bakteryjnych w trzeciej godzinie inkubacji z surowicą. Wskazuje to przyrost liczby kolonii bakteryjnych na sektorach płytki na Ryc. 21a. Taki wynik eksperymentu interpretowany był dla szczepu opornego na działanie ludzkiej surowicy. Z kolei obraz zaprezentowany na Ryc. 21b pokazuje zmniejszenie się liczby kolonii bakteryjnych w czasie 3 godzin inkubacji badanego szczepu z 50% roztworem surowicy ludzkiej, co jest widoczne na sektorach prezentowanych płytek. Taki wynik badania oznacza wrażliwość danego szczepu na działanie surowicy ludzkiej.

Wyniki przeprowadzonego badania przeżywalności izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w surowicy ludzkiej przedstawiono w Tab. 30, Tab. 31 oraz Tab. 32. Dla wszystkich szczepów z każdego z 3 trzech powtórzeń eksperymentu obliczono średnią wartość cfu/ml oraz log z wartości cfu/ml dla każdego czasu inkubacji.

Wyniki przeżywalności szczepów w aktywnej 50% NHS przedstawiono w Tab. 30, natomiast wyniki przeżywalności szczepów w nieaktywnej 50% surowicy - kontroli eksperymentu - przedstawiono w Tab. 31. Dla każdego z badanych szczepów została również określona ich przeżywalność wyrażona w procentach, określająca zdolność namnażania się badanych szczepów w obecności surowicy. Na podstawie danych zamieszczonych w Tab. 32 sporządzono wykresy obrazujące różnice w wartościach log z cfu/ml badanych szczepów oraz wykresy obrazujące ich przeżywalność w surowicy wyrażoną w procentach.

Tabela 30. Wyniki przeżywalności badanych szczepów kontrolnych PCM oraz izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w aktywnej 50% NHS (Sigma-Aldrich)

Liczba	Gatunek	Oznaczenie	Wartość cfu/ml				Wartość log cfu/ml			
			T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	*S. marcescens*	ko11.5d	$1,43 \times 10^7 \pm 4,63 \times 10^6$	$3,45 \times 10^7 \pm 2,03 \times 10^7$	$1,78 \times 10^7 \pm 1,53 \times 10^7$	$4,92 \times 10^7 \pm 2,33 \times 10^7$	7,15 ± 0,13	7,54 ± 4,35	7,15 ± 0,35	7,69 ± 0,19
2	*S. marcescens*	41śg.2d	$1,48 \times 10^7 \pm 4,45 \times 10^6$	$2,04 \times 10^4 \pm 7,40 \times 103$	0	0	7,17 ± 0,14	4,3 ± 0,18	0	0
3	*S. marcescens*	52śg.4c	$1,67 \times 10^7 \pm 8,01 \times 10^6$	$1,30 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	$3,20 \times 10^4 \pm 3,35 \times 10^4$	$4,23 \times 10^4 \pm 1,80 \times 10^4$	7,22 ± 0,20	5,11 ± 0,09	4,5 ± 0,39	4,62 ± 0,17
4	*S. marcescens*	kg6.2c	$1,90 \times 10^7 \pm 7,24 \times 10^6$	$5,40 \times 10^6 \pm 2,30 \times 10^6$	$6,00 \times 10^7 \pm 4,05 \times 10^7$	$2,57 \times 108 \pm 1,13 \times 10^8$	7,27 ± 0,17	6,73 ± 0,15	7,77 ± 0,23	8,4 ± 0,22
5	*S. liquefaciens*	kg40.1d	$1,45 \times 10^7 \pm 3,94 \times 10^6$	$2,05 \times 10^7 \pm 6,35 \times 10^6$	$3,55 \times 107 \pm 8,26 \times 10^6$	$4,58 \times 107 \pm 1,48 \times 10^7$	7,16 ± 0,12	7,31 ± 0,15	7,55 ± 0,12	7,66 ± 0,17
6	*S. liquefaciens*	97dz	$1,36 \times 10^7 \pm 4,77 \times 10^6$	$2,06 \times 10^5 \pm 5,65 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4 \pm 8,67 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3 \pm 2,65 \times 10^3$	7,13 ± 0,16	5,31 ± 0,12	4,29 ± 0,19	3,6 ± 0,42
7	*S. liquefaciens*	3s	$1,08 \times 10^7 \pm 8,82 \times 10^6$	$2,92 \times 10^6 \pm 4,67 \times 10^5$	$2,14 \times 10^6 \pm 1,14 \times 10^6$	$4,21 \times 10^7 \pm 1,09 \times 10^7$	7,03 ± 0,30	6,46 ± 0,08	6,33 ± 0,22	7,62 ± 0,10
8	*S. liquefaciens*	120dz	$1,72 \times 10^7 \pm 7,11 \times 10^6$	$1,12 \times 10^7 \pm 3,00 \times 10^6$	$2,72 \times 10^7 \pm 1,18 \times 10^7$	$3,23 \times 10^7 \pm 1,60 \times 10^7$	7,23 ± 0,16	7,05 ± 0,11	7,43 ± 0,16	7,5 ± 0,20
9	*S. liquefaciens*	139dz	$2,53 \times 10^7 \pm 2,21 \times 10^7$	$2,40 \times 10^7 \pm 1,90 \times 10^7$	$3,92 \times 10^7 \pm 1,96 \times 10^7$	$5,00 \times 107 \pm 2,35 \times 10^7$	7,4 ± 0,28	7,38 ± 0,29	7,59 ± 0,23	7,69 ± 0,24
10	*S. liquefaciens*	130dz	$1,61 \times 10^7 \pm 9,72 \times 10^6$	$1,25 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7 \pm 7,65 \times 10^6$	$6,36 \times 10^7 \pm 2,41 \times 10^7$	7,2 ± 2,97	7,17 ± 2,95	7,25 ± 0,17	7,8 ± 0,13

Tabela 31. Wyniki przeżywalności szczepów kontrolnych PCM oraz izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* w inaktywowanej 50% NHS (Sigma-Aldrich)

Liczba	Gatunek	Oznaczenie	Wartość cfu/ml				Wartość log cfu/ml			
			T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	*S. marcescens*	ko11.5d	$2,92 \times 10^7 \pm 1,74 \times 10^7$	$3,38 \times 10^7 \pm 1,39 \times 10^7$	$2,56 \times 10^8 \pm 9,91 \times 10^7$	$4,28 \times 10^8 \pm 1,51 \times 10^8$	7,46 ± 0,20	7,53 ± 0,16	8,40 ± 0,18	8,63 ± 0,14
2	*S. marcescens*	41śg.2d	$1,92 \times 10^7 \pm 8,21 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7 \pm 1,41 \times 10^7$	$2,01 \times 10^8 \pm 8,11 \times 10^7$	$3,30 \times 10^8 \pm 8,43 \times 10^7$	7,28 ± 0,20	7,48 ± 0,21	8,30 ± 0,17	8,52 ± 0,12
3	*S. marcescens*	52śg.4c	$1,50 \times 10^7 \pm 7,64 \times 10^6$	$2,48 \times 10^7 \pm 1,32 \times 10^7$	$2,54 \times 10^7 \pm 8,53 \times 10^6$	$2,46 \times 10^8 \pm 9,24 \times 10^7$	7,17 ± 0,18	7,39 ± 0,28	7,40 ± 0,13	8,39 ± 0,17
4	*S. marcescens*	kg6.2c	$3,47 \times 10^7 \pm 2,07 \times 10^7$	$2,18 \times 10^7 \pm 8,26 \times 10^6$	$3,00 \times 10^8 \pm 3,43 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8 \pm 1,59 \times 10^8$	7,54 ± 0,23	7,33 ± 0,19	8,48 ± 0,34	8,69 ± 0,12
5	*S. liquefaciens*	kg40.1d	$2,80 \times 10^7 \pm 6,40 \times 10^6$	$3,31 \times 10^7 \pm 1,64 \times 10^7$	$2,30 \times 10^8 \pm 7,24 \times 10^7$	$3,90 \times 10^8 \pm 2,71 \times 10^8$	7,31 ± 0,16	7,51 ± 0,25	8,36 ± 0,17	8,59 ± 3,49
6	*S. liquefaciens*	97dz	$1,78 \times 10^7 \pm 7,33 \times 10^6$	$1,75 \times 10^7 \pm 4,81 \times 10^6$	$3,28 \times 10^7 \pm 1,34 \times 10^7$	$2,52 \times 10^8 \pm 9,97 \times 10^7$	7,25 ± 0,17	7,24 ± 0,13	7,51 ± 0,24	8,40 ± 0,20
7	*S. liquefaciens*	3s	$4,18 \times 10^7 \pm 2,09 \times 10^7$	$2,13 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^7$	$2,96 \times 10^8 \pm 2,21 \times 10^8$	$1,87 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^7$	7,62 ± 0,19	7,32 ± 0,24	8,47 ± 0,33	8,27 ± 0,04
8	*S. liquefaciens*	120dz	$1,93 \times 10^7 \pm 5,89 \times 10^6$	$2,75 \times 10^7 \pm 1,61 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7 \pm 1,26 \times 10^8$	$1,73 \times 10^8 \pm 7,97 \times 10^7$	7,29 ± 0,12	7,44 ± 0,20	7,57 ± 0,40	8,23 ± 0,21
9	*S. liquefaciens*	139dz	$1,87 \times 10^7 \pm 1,97 \times 10^6$	$1,15 \times 10^7 \pm 4,28 \times 10^6$	$3,88 \times 10^7 \pm 2,08 \times 10^7$	$2,94 \times 10^8 \pm 5,66 \times 10^7$	7,27 ± 0,05	7,06 ± 0,14	7,58 ± 0,19	8,47 ± 0,18
10	*S. liquefaciens*	130dz	$1,56 \times 10^7 \pm 1,75 \times 10^7$	$4,28 \times 10^7 \pm 2,79 \times 10^7$	$3,85 \times 10^7 \pm 7,84 \times 10^6$	$2,18 \times 10^8 \pm 9,60 \times 10^7$	7,19 ± 0,26	7,63 ± 0,30	7,58 ± 0,08	8,33 ± 0,17

Tabela 32. Przeżywalność badanych szczepów w aktywnej oraz w nieaktywnej 50% NHS (Sigma-Aldrich)

Liczba	Gatunek	Oznaczenie	Przeżywalność [%] szczepu w aktywnej 50% NHS				Poziom wrażliwości	Przeżywalność szczepu w inaktywowanej 50% NHS			
			T0	T1	T2	T3		T0	T1	T2	T3
1	*S. marcescens*	ko11.5d	100 + 1,93	105 + 1,13	100 + 4,90	107 + 2,50	oporny	100 + 2,76	101 + 2,04	112 + 1,99	116 + 1,61
2	*S. marcescens*	41śg.2d	100 + 1,87	60 + 4,12	0	0	wrażliwy	100 +2,80	103 + 2,84	114 + 2,10	117 + 1,40
3	*S. marcescens*	52śg.4c	100 + 2,72	71 + 1,87	62 + 8,34	64 + 3,23	średnio wrażliwy	100 + 2,49	103 + 3,86	103 + 1,72	117 + 2,05
4	*S. marcescens*	kg6.2c	100 + 2,34	93 + 2,24	107 + 3,02	116 + 2,63	oporny	100 + 3,03	97 + 6,75	112 + 4,05	115 + 1,42
5	*S. liquefaciens*	kg40.1d	100 + 1,71	102 + 0,96	105 +1,61	107 + 2,27	oporny	100 + 2,14	103 + 3,42	114 + 2,07	117 + 40,61
6	*S. liquefaciens*	97dz	100 + 2,23	74 + 2,25	60 + 4,57	50 + 11,76	średnio wrażliwy	100 + 2,44	100 + 1,89	104 + 3,23	116 + 6,38
7	*S. liquefaciens*	3s	100 + 4,31	92 + 1,19	90 + 3,48	108 + 1,37	oporny	100 + 2,53	96 + 3,25	111 + 3,92	108 + 0,57
8	*S. liquefaciens*	120dz	100 + 2,27	97 + 1,56	103 + 2,08	104 + 2,75	oporny	100 + 1,69	102 + 2,59	104 + 21,95	113 + 2,56
9	*S. liquefaciens*	139dz	100 + 3,59	99 + 4,00	103 + 2,68	104 + 3,19	oporny	100 + 0,68	97 + 1,92	104 + 2,47	116 + 5,17
10	*S. liquefaciens*	130dz	100 + 41,24	99 + 41,18	101 + 2,40	108 + 1,81	oporny	100 + 3,63	106 + 4,02	105 + 1,20	116 + 2,13

Do analizy przeżywalności w 50% aktywnej surowicy ludzkiej wybrano 4 izolaty *S. marcescens* pozyskane z tuszy krowy domowej (ko11.5d, kg6.2c) oraz 2 izolaty pozyskane z tuszy świni domowej (41śg.2d, 52śg.4c). Wyniki tej analizy przedstawiono na Ryc. 21.1, 21.4 oraz Ryc. 21.2 i 21.3. Izolat ko11.5d pozyskany z odbytnicy tuszy krowy domowej, jak i izolat kg6.2c pozyskany z jamy nosowo-gardłowej tuszy krowy domowej, wykazywały oporność na badaną surowicę NHS (Ryc. 21.1ab i Ryc. 21.4ab). Prezentowane wykresy pokazują podobieństwo we wzroście komórek tych izolatów zarówno w aktywnej (Ryc. 21.1ab, Ryc. 21.4ab) oraz w inaktywowanej surowicy (Ryc. 22.1ab, Ryc. 22.4ab). Odmienna sytuacja występuje dla izolatu 41śg.2d pozyskanego od świni domowej. *S. marcescens* 41śg.2d wykazuje wrażliwość na działanie 50% NHS, co pokazuje wykres na Ryc. 21.2a i Ryc. 21.2b, w którym obserwowany jest spadek liczby komórek bakterii wraz ze wzrostem czasu inkubacji z roztworem surowicy. Jednakże dla *S. marcescens* 41śg.2d całkowite zahamowanie wzrostu obserwowane jest dopiero w drugiej godzinie inkubacji. *S. marcescens* 52śg.4c pozyskana z tuszy świni domowej jest w mniejszym stopniu oporna na działanie 50% NHS. Rycina 21.3ab pokazuje spadek wzrostu liczby komórek bakterii w zależności od czasu inkubacji z surowicą.

Badanie przeżywalności w roztworze 50% NHS przetestowano dla 1 izolatu *S. liquefaciens* pozyskanego z tuszy krowy domowej (kg40.1d), 1 izolatu z tuszy sarny europejskiej (3s) oraz dla 4 izolatów z tusz dzików euroazjatyckich (97dz, 120dz, 139dz, 130dz).

S.liquefaciens kg40.1d wyizolowana od krowy domowej z jamy nosowo-gardłowej wykazała oporność na bakteriobójcze działanie 50% NHS. Wzrost bakterii w obecności aktywnej i inaktywowanej 50% NHS przedstawiony na Ryc. 21.5ab oraz Ryc. 22.5ab.

S. liquefaciens 3s pozyskana od sarny europejskiej jest oporna na działanie 50% ludzkiej surowicy, co potwierdzono na Ryc. 21.7ab. Wzrost szczepu w aktywnej (Ryc. 21.7ab) i nieaktywnej (Ryc. 22.7ab) surowicy jest bardzo podobny.

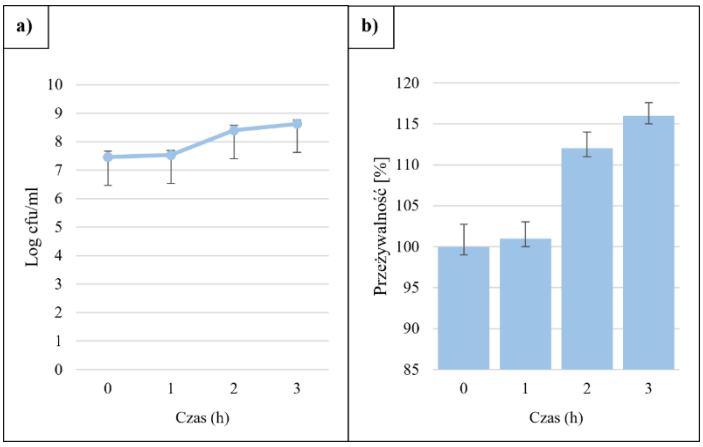
Badane izolaty *S. liquefaciens* wyizolowane od dzików euroazjatyckich są w większości oporne na działanie aktywnej 50% NHS. Potwierdzają to wyniki zaprezentowane na Ryc. 21.8ab, Ryc. 21.9ab, Ryc. 21.10ab. Prezentują one podobieństwa we wzroście w aktywnej (Ryc. 21.8ab, Ryc. 21.19ab, Ryc. 21.10ab) i inaktywowanej (Ryc. 22.8ab, Ryc. 22.9ab, Ryc. 22.10ab) surowicy. Oporność na surowicę stwierdzono dla izolatów *S. liquefaciens* 120dz, 130dz i 139dz. Odmienna sytuacja występuje dla izolatu 97dz, który jako jedyny z badanych wykazuje średnią wrażliwość na działanie 50% NHS. Również zaprezentowany na Ryc. 21.6ab wykres pokazuje spadek liczby komórek izolatu 97dz wraz ze wzrostem czasu inkubacji, jednakże spadek nie jest całkowity.

Rycina 21. Przeżywalność badanych szczepów w aktywnej 50% NHS

1

***Serratia marcescens* ko11.5d**

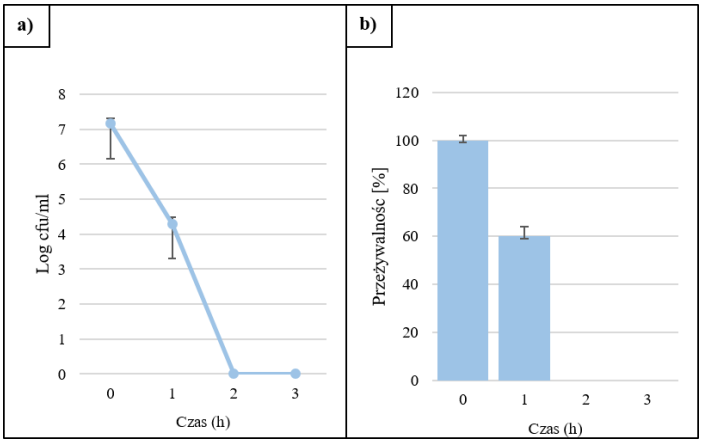
- Szczep pozyskany od krowy domowej
- Szczep **oporny** na 50% NHS



2

***Serratia marcescens* 41śg.2d**

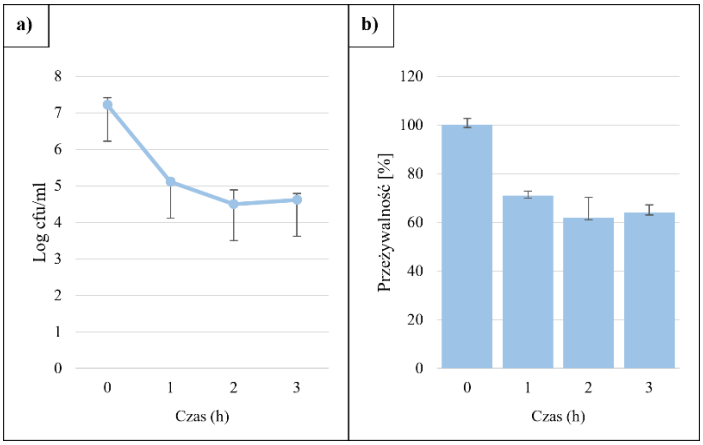
- Szczep pozyskany od świni domowej
- Szczep **wrażliwy** na 50% NHS



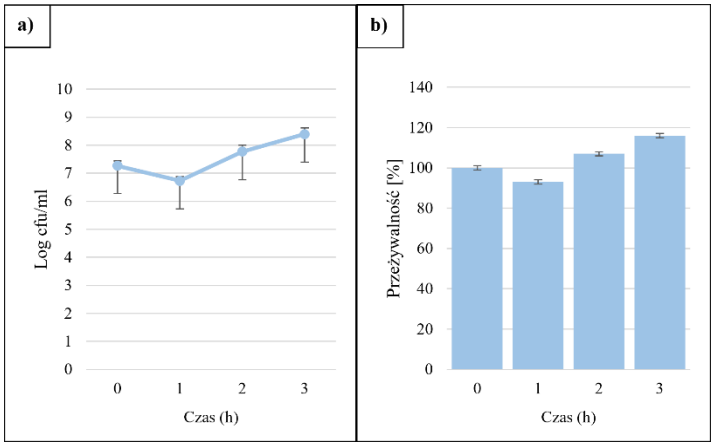
3

***Serratia marcescens* 52śg.4c**

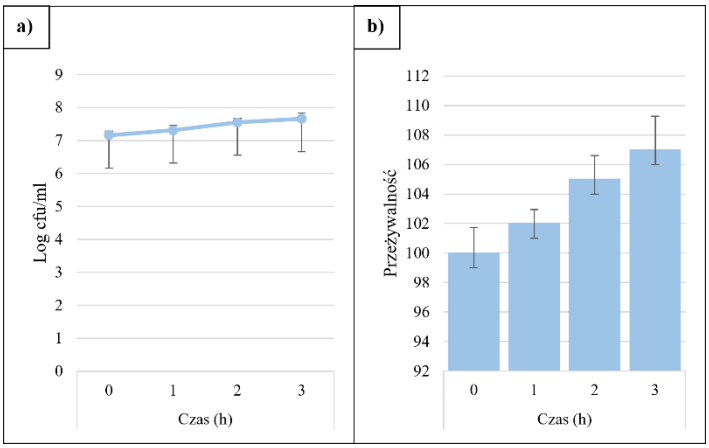
- Szczep pozyskany od świni domowej
- Szczep **średnio wrażliwy** na 50% NHS



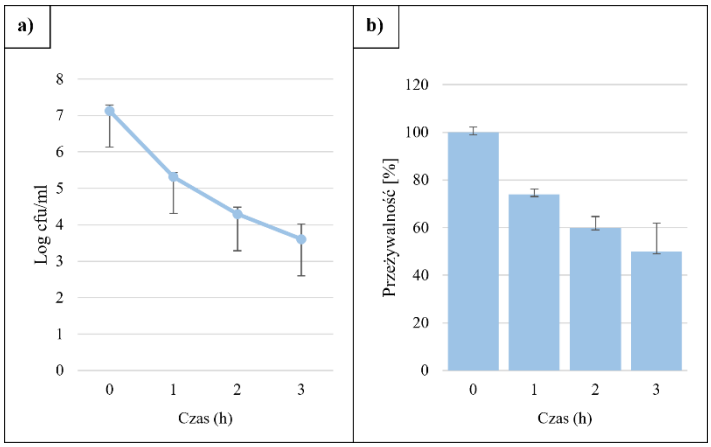
4
Serratia marcescens **kg6.2c** • Szczep pozyskany od krowy domowej • Szczep **oporny** na 50% NHS



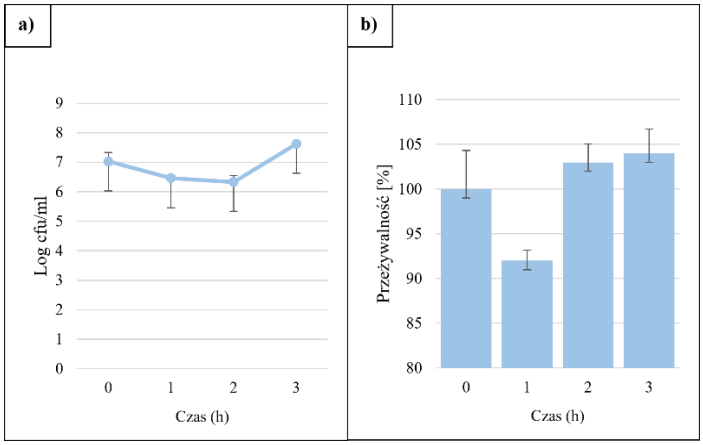
5
Serratia liquefaciens **kg40.1d** • Szczep pozyskany od krowy domowej • Szczep **oporny** na 50% NHS



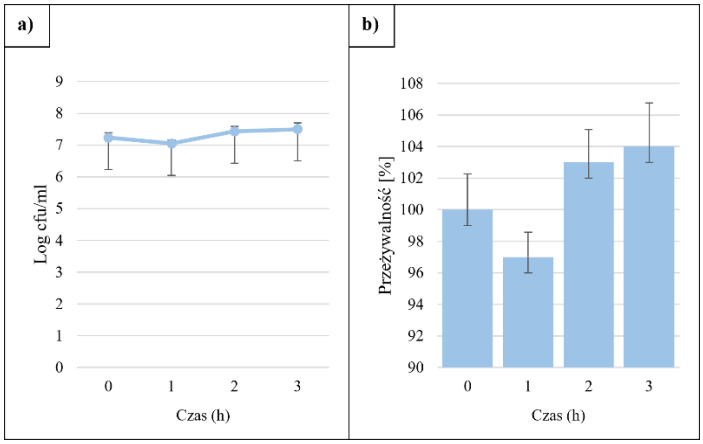
6
Serratia liquefaciens **97dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego • Szczep **średnio wrażliwy** na 50% NHS



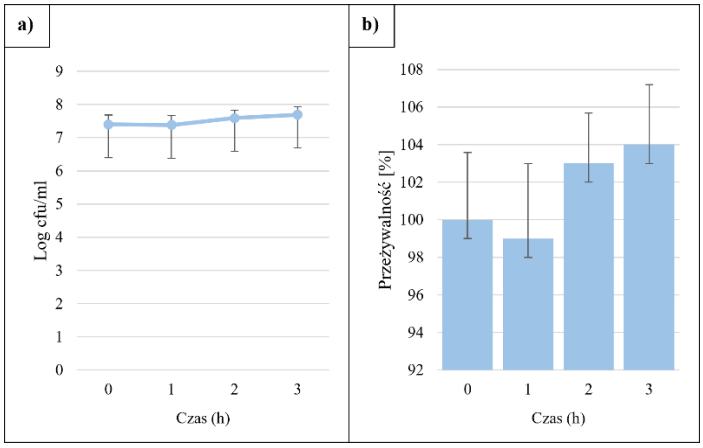
7
***Serratia liquefaciens* 3s** • Szczep pozyskany od sarny europejskiej • Szczep **oporny** na 50% NHS



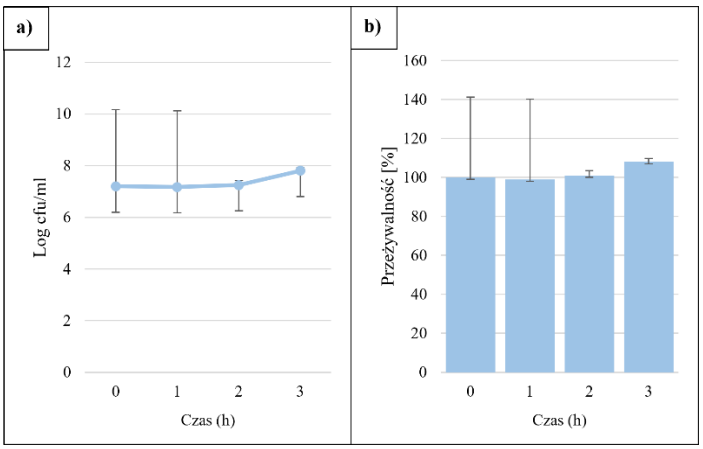
8
***Serratia liquefaciens* 120dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego • Szczep **oporny** na 50% NHS



9
***Serratia liquefaciens* 139dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego • Szczep **oporny** na 50% NHS



10
***Serratia liquefaciens* 130dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego • Szczep **oporny** na 50% NHS

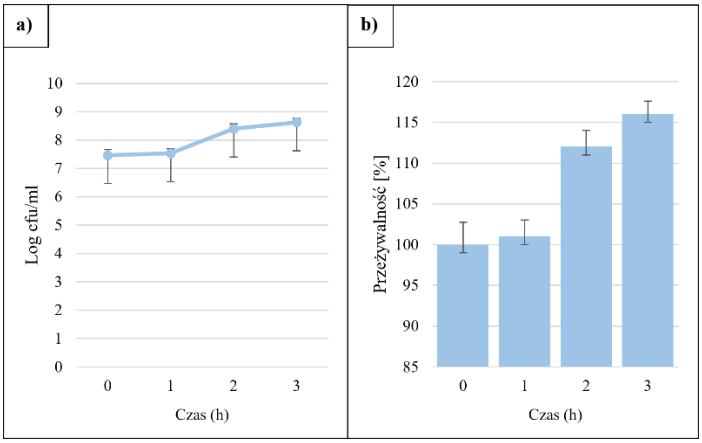


Rycina 22. Przeżywalność badanych szczepów w inaktywowanej 50% NHS

1

***Serratia marcescens* ko11.5d**

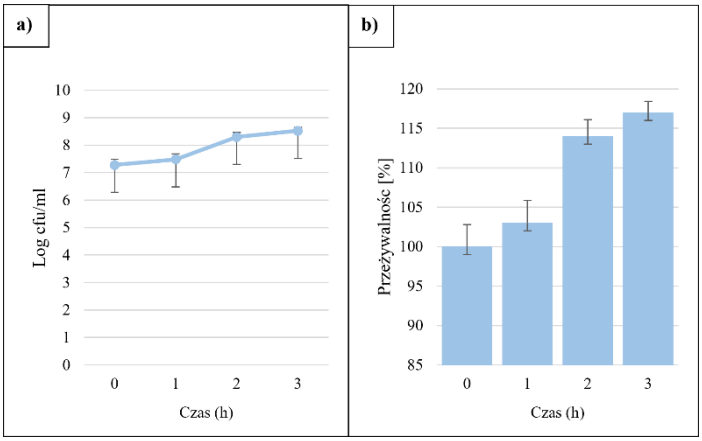
- Szczep pozyskany od krowy domowej



2

***Serratia marcescens* 41śg.2d**

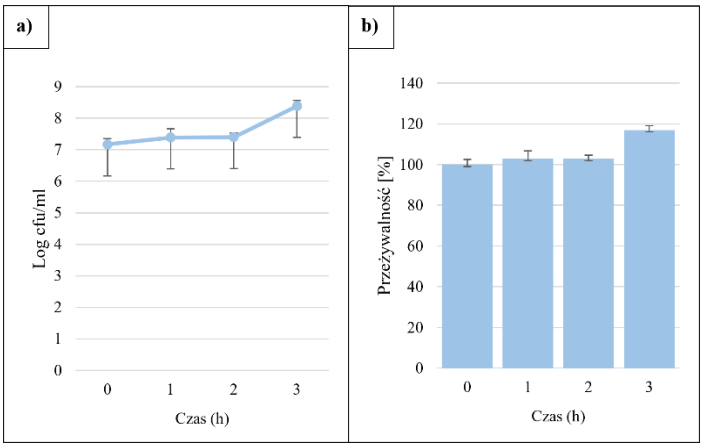
- Szczep pozyskany od świni domowej



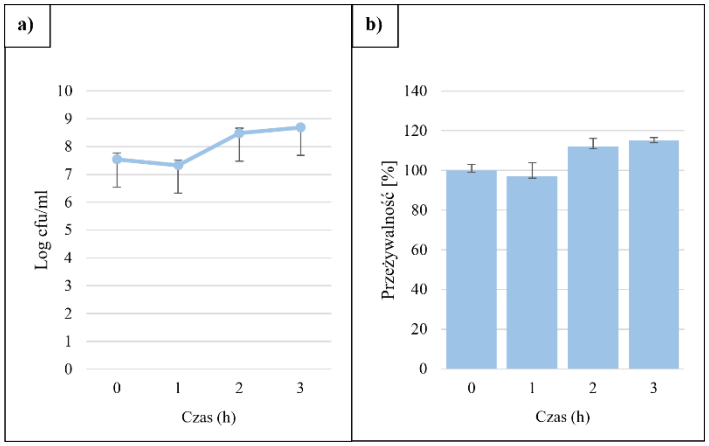
3

***Serratia marcescens* 52śg.4c**

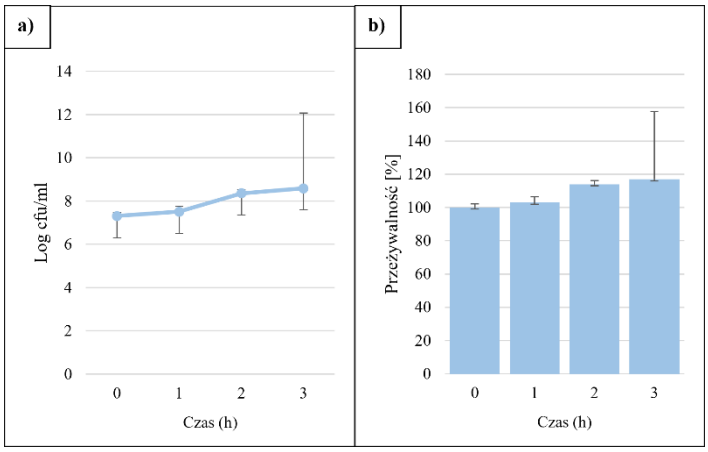
- Szczep pozyskany od świni domowej



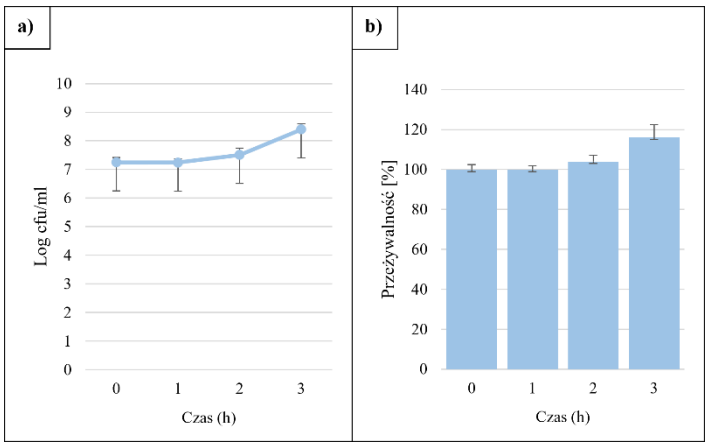
4
Serratia marcescens **kg6.2c** • Szczep pozyskany od krowy domowej



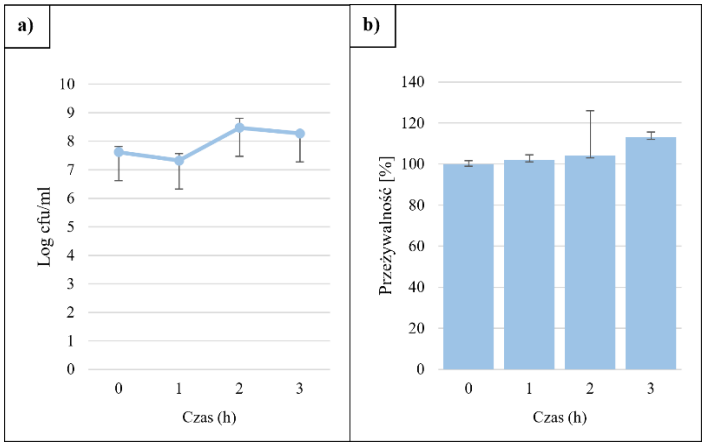
5
Serratia liquefaciens **kg40.1d** • Szczep pozyskany od krowy domowej



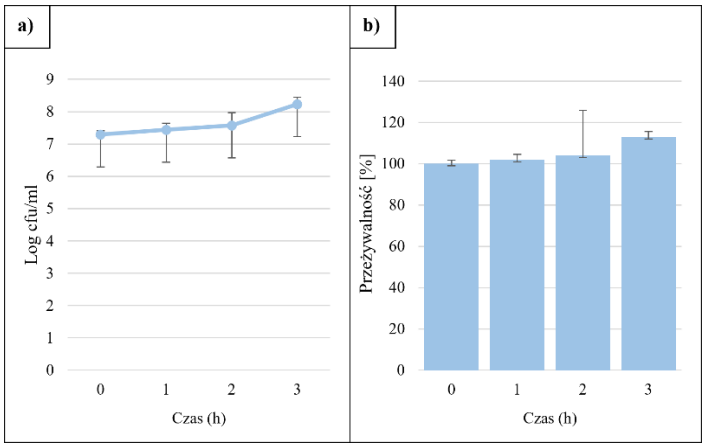
6
Serratia liquefaciens **97dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego



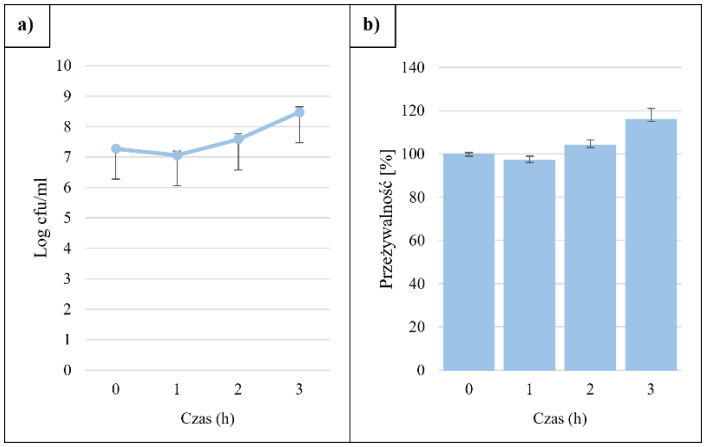
7
***Serratia liquefaciens* 3s** • Szczep pozyskany od sarny europejskiej



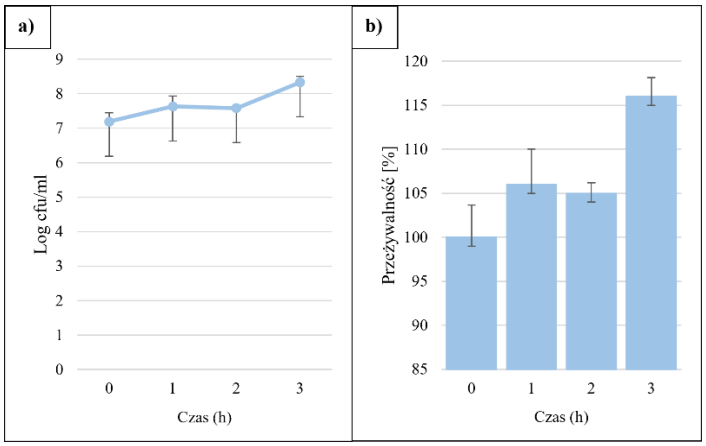
8
***Serratia liquefaciens* 120dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego



9
***Serratia liquefaciens* 139dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego



10
***Serratia liquefaciens* 130dz** • Szczep pozyskany od dzika euroazjatyckiego

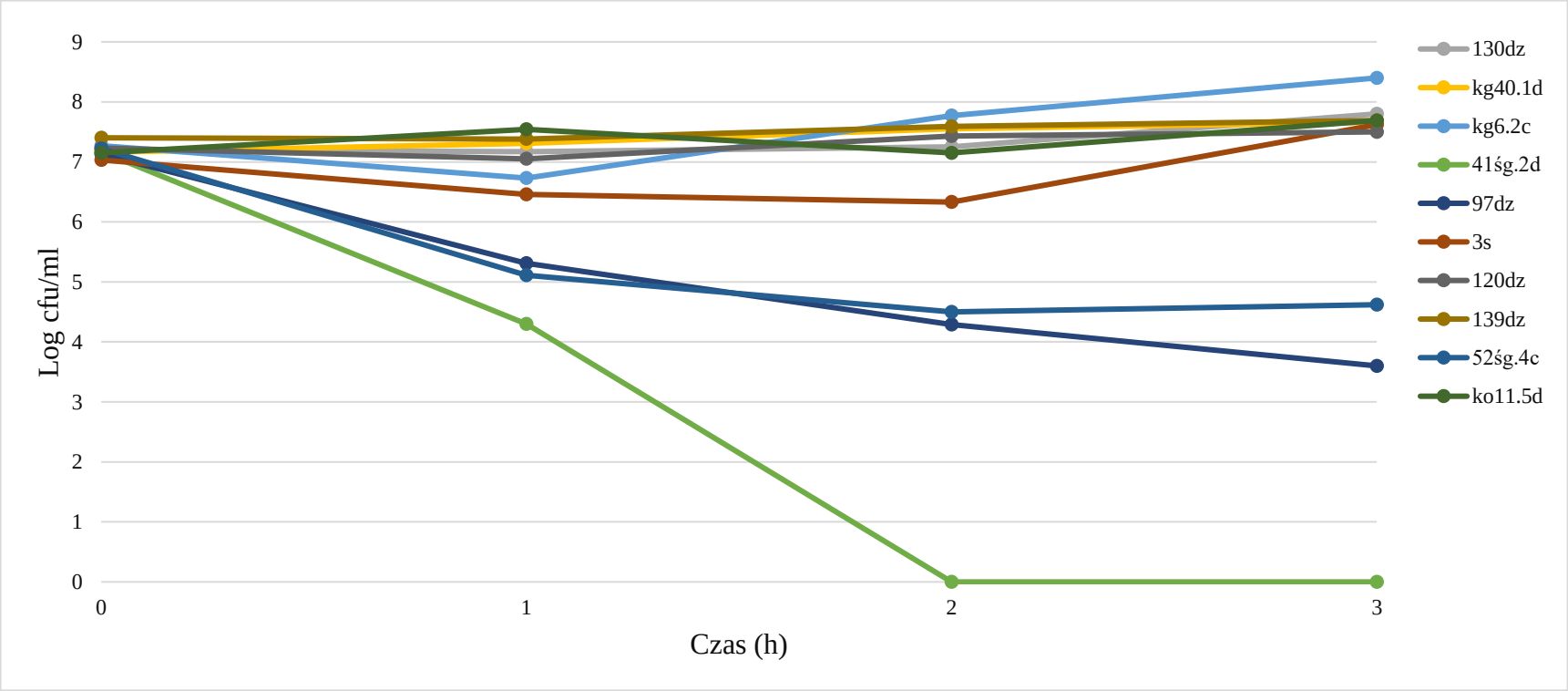


Ryc. 23 pokazuje, że w obrębie badanych izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* największą wrażliwość na działanie NHS wykazywały izolaty 41śg.2d, 97dz oraz izolat 52śg.4c. Natomiast do grupy szczepów opornych zaliczają się izolaty ko11.5d, kg40.1d, 120dz, 139dz, kg6.2c oraz 130dz.

Wśród wszystkich badanych odzwierzęcych *S. marcescens* największą oporność na 50% NHS wykazywały szczepy kg6.2c i ko11.5d pozyskane z jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy krowy domowej. Szczep *S. marcescens* (52śg.4c) pochodzący z jamy nosowo-gardłowej świni domowej wykazywał średnią wrażliwość na badaną surowicę. Z kolei największą wrażliwość wykazywał szczep 41śg.2d pozyskany również z jamy nosowo-gardłowej świni domowej. Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, że najbardziej opornymi odzwierzęcymi szczepami *S. marcescens* były te pochodzące od krów domowych. Z kolei szczepy *S. marcescens* pochodzące od świń domowych to szczepy wrażliwe lub średnio wrażliwe na działanie ludzkiej surowicy.

W obrębie badanych izolatów *S. liquefaciens* największą opornością charakteryzowały się szczepy kg40.1d, 3s, 120dz, 139dz oraz 130dz pozyskane z jamy nosowo-gardłowej krowy domowej oraz dzików euroazjatyckich. Natomiast dla szczepu 97dz pozyskanego z jamy nosowo-gardłowej dzika euroazjatyckiego określono średnią wrażliwość na działanie ludzkiej surowicy. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, iż odzwierzęce szczepy *S. liquefaciens* są w większości oporne na działanie ludzkiej surowicy, bez względu na źródło ich izolacji.

Rycina 23. Przeżywalność badanych izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens* w aktywnej 50% NHS



Legenda:
130dz – izolat *S. liquefaciens* od dzika euroazjatyckiego; kg40.1d – izolat *S. liquefaciens* od krowy domowej; kg6.2c – izolat *S. marcescens* od krowy domowej; 41śg.2d – izolat *S. marcescens* od świni domowej; 97dz – izolat *S. liquefaciens* od dzika euroazjatyckiego; 3s – izolat *S. liquefaciens* od sarny europejskiej; 120dz – izolat *S. liquefaciens* od dzika euroazjatyckiego; 139dz – izolat *S. liquefaciens* od dzika euroazjatyckiego; 52śg.4c – izolat *S. marcescens* od świni domowej; ko11.5d – izolat *S. marcescens* od krowy domowej

Podsumowanie

- Najbardziej opornym na 50% NHS izolatem *S. liquefaciens* był izolat kg40.1d od krowy domowej (*Bos taurus taurus*).
- Najbardziej wrażliwym na 50% NHS izolatem *S. liquefaciens* był 97dz pozyskany od dzika euroazjatyckiego (*Sus scrofa*).
- Najbardziej opornym na 50% NHS izolatem *S. marcescens* był izolat ko11.5d od krowy domowej (*Bos taurus taurus*).
- Najbardziej wrażliwym na 50% NHS izolatem *S. marcescens* był 41śg.2d pozyskany od świni domowej (*Sus scrofa domestica*).

14. Podsumowanie pracy

Pracę doktorską realizowano na materiale mikrobiologicznym pozyskanym z wymazów jamy nosowo-gardłowej 460 tusz dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) oraz wymazów jamy nosowo-gardłowej 93 tusz sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*). Materiał do badań stanowiły również wymazy jamy nosowo-gardłowej i odbytnicy 55 tusz krowy domowej (*Bos taurus taurus*) oraz 59 tusz świń domowych (*Sus scrofa domestica*).

W pierwszym etapie badań prowadzona izolacja skierowana na pozyskiwanie bakterii Gram-ujemnych z wymazów z tusz zwierząt pozwoliła na otrzymanie 460 izolatów od dzików euroazjatyckich oraz 82 izolatów od saren europejskich. Z wymazów mikrobiologicznych, pozyskanych z tusz krów domowych, otrzymano 228 izolatów z jamy nosowo-gardłowej oraz 208 izolatów z odbytnicy, natomiast z tusz świń domowych otrzymano 200 izolatów z jamy nosowo-gardłowej i 70 izolatów z odbytnicy.

W następnej kolejności wszystkie uzyskane izolaty bakteryjne (1138) oznaczane były za pomocą metody MALDI Biotyper. Z 460 izolatów z jamy nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich przyporządkowano do poziomu rodzaju i gatunku 421 izolatów, natomiast z 82 izolatów z jamy nosowo-gardłowej saren europejskich zidentyfikowano 70 izolatów. Z 228 izolatów z jamy nosowo-gardłowej tusz krów domowych oznaczono 208 izolatów, z kolei z wymazów z odbytnicy zidentyfikowano 195 izolatów z pozyskanych 208. Zastosowana metoda pozwoliła również na oznaczenie 188 z 200 izolatów pozyskanych z jamy nosowo-gardłowej tusz świń domowych oraz 58 z 70 izolatów z wymazów z odbytnicy tusz świń domowych.

Badanie na obecność enzymów zewnątrzkomórkowych: deoksyrybonukleazy, lipazy, żelatynazy i hemolizyny przeprowadzono na 67 izolatach od dzików euroazjatyckich (63 izolaty *S. liquefaciens*, 4 izolaty *S. marcescens*), 14 izolatach od saren europejskich (14 izolatów *S. liquefaciens*, 0 izolatów *S. marcescens*), 38

izolatach od krów domowych (28 izolatów *S. liquefaciens*, 10 izolatów *S. marcescens*) oraz na 38 izolatach od świń domowych (27 izolatów *S. liquefaciens,* 11 izolatów *S. marcescens*). Przeprowadzone badania wykazały obecność enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy u większości izolatów *S. liquefaciens* oraz u wszystkich izolatów *S. marcescens*. Obecność enzymu hemolizyny stwierdzano najczęściej dla izolatów *S. liquefaciens* pozyskanych z tusz świń domowych oraz dla izolatów *S. marcescens* pozyskanych od dzików euroazjatyckich.

Kolejne badania w pracy doktorskiej przeprowadzono celem potwierdzenia obecności genów wirulencji kodujących wybrane czynniki wirulencji (fimbrie typu I, białka fosfolipazy A oraz białka toksyny hemolitycznej ShlA). Eksperyment ten przeprowadzono dla 43 izolatów od dzików euroazjatyckich (39 izolatów *S. liquefaciens*, 4 izolatów *S. marcescens*), 13 izolatów od saren europejskich (13 izolatów *S. liquefaciens*, 0 izolatów *S. marcescens*), 26 izolatów od krów domowych (21 izolatów *S. liquefaciens*, 5 izolatów *S. marcescens*) oraz dla 37 izolatów od świń domowych (26 izolatów *S. liquefaciens*, 11 izolatów *S. marcescens*). Najczęściej badane geny wirulencji występowały u izolatów *S. liquefaciens* od saren europejskich i świń domowych. Natomiast w przypadku izolatów *S. marcescens* najczęściej badane geny wirulencji występowały u izolatów od krów domowych i dzików euroazjatyckich.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono eksperyment mający na celu określenie długości O-swoistego łańcucha LPS wśród izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*. Badanie to przeprowadzono dla 25 izolatów *S. liquefaciens* (11 izolatów od dzików euroazjatyckich, 5 izolatów od saren europejskich, 5 izolatów od krów domowych i 4 izolatów od świń domowych). Przedmiotem badań było również 8 izolatów *S. marcescens* (3 izolaty od dzików euroazjatyckich, 2 izolaty od krów domowych i 3 izolatów od świń domowych). Badanie to pokazało, że wszystkie testowane izolaty posiadały długi O-swoisty łańcuch LPS.

Ostatnie doświadczenie w pracy doktorskiej przeprowadzono łącznie dla 10 izolatów *S. liquefaciens* (6 izolatów) i *S. marcescens* (4 izolaty). Wśród badanych 6 izolatów *S. liquefaciens* 4 izolaty pochodziły od dzików europejskich, 1 izolat pochodził od krowy domowej i 1 izolat pochodził od sarny europejskiej. Natomiast wśród 4 izolatów *S. marcescens* 2 izolaty pochodziły od krowy domowych i 2 izolaty pochodziły od świni domowej.

Tabela 32 pokazuje zestawienie charakterystyki wybranych szczepów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*, dla których zostało przeprowadzone ostanie badanie w pracy doktorskiej.

Tabela 33. Charakterystyka wybranych szczepów *S. liquefaciens* i *S. marcescens*

Lp.	Gatunek bakterii	Oznaczenie	Źródło izolacji	Nr PCM	Obecność deoksyrybo-nukleazy	Obecność lipazy	Obecność żelatynazy	Obecność hemolizyny	Obecność genów wirulencji					Długość O-swoistego łańcucha LPS	Wrażliwość na NHS
									fimA	*shlA*	*shlB*	*phlA*	*phlB*		
1	*S. liquefaciens*	130dz	dzik euroazjatycki	3245	+	+	+	+	+	+	−	+	+	L-OAg	oporny
2	*S. liquefaciens*	kg40.1d	krowa domowa	3246	+	+	+	−	−	+	−	+	+	L-OAg	oporny
3	*S. liquefaciens*	139dz	dzik euroazjatycki	3247	+	+	+	−	+	+	−	−	+	L-OAg	oporny
4	*S. liquefaciens*	120dz	dzik euroazjatycki	3248	+	+	+	+	+	+	−	+	+	L-OAg	wrażliwy
5	*S. liquefaciens*	97dz	dzik euroazjatycki	3249	+	+	+	−	+	+	+	−	+	L-OAg	średnio oporny
6	*S. liquefaciens*	3s	sarna europejska	3250	−	+	+	+	+	+	−	+	+	L-OAg	oporny
7	*S. marcescens*	41śg.2d	świnia domowa	3251	+	+	+	−	−	+	+	+	−	L-OAg	oporny
8	*S. marcescens*	kg6.2c	krowa domowa	3252	+	+	+	+	+	+	−	+	+	L-OAg	oporny
9	*S. marcescens*	51śg.2c	świnia domowa	3253	+	+	+	−	+	+	+	+	+	L-OAg	średnio oporny
10	*S. marcescens*	ko11.5d	krowa domowa	3254	+	+	+	+	+	−	−	+	−	L-OAg	oporny

Legenda:
fimA – *gen kodujący fimbrie typu I,* ***phlA, phlB*** – *geny kodujące białka fosfolipazy A,* ***shlA, shlB*** – *geny kodujące białka ShlA, ShlB toksyny hemolitycznej,*
L-OAg – *Long O-Antigen*, LPS z długim O-swoistym łańcuchem, **NHS** – *Normal Human Serum*, normalna surowica ludzka

Szczep *S. liquefaciens* 130dz został pozyskany od dzika euroazjatyckiego. Posiada on enzymy deoksyrybonukleazę, lipazę, żelatynę i hemolizynę. Detekcja genów wirulencji wykazała, że ma on gen kodujący fimbrie typu I oraz geny kodujące białka związane z fosfolipazą A. Jednakże nie posiada on wszystkich genów kodujących białka toksyny hemolitycznej, co powoduje, iż nie jest ona aktywna. Szczep 130dz posiada długi O-swoisty łańcuch LPS oraz jednocześnie jest oporny na 50% surowicę (Tab. 32).

Szczep *S. liquefaciens* kg40.1d został wyizolowany z tuszy krowy domowej. *S. liquefaciens* kg40.1d posiada enzymy deoksyrybonukleazę, lipazę oraz żelatynazę, jednakże nie posiada enzymu zewnątrzkomórkowego hemolizyny. Szczep ten nie posiada genu kodującego fimbrie typu I oraz białka ShlB toksyny hemolitycznej. Udowodniono występowanie u niego genów kodujących białko ShlA toksyny hemolitycznej oraz genów kodujących białka związane z fosfolipazą A. Dodatkowo posiada długi O-swoisty łańcuch LPS i jest oporny na działanie ludzkiej surowicy (Tab. 32).

S. liquefaciens 139dz została wyizolowana z tuszy dzika europejskiego. Szczep ten posiada enzymy deoksyrybonukleazę, lipazę i żelatynazę. Nie udowodniono u niego występowania enzymu hemolizyny. Przeprowadzone badanie detekcji genów wirulencji wykazało występowanie genów kodujących fimbrie typu I, białka ShlA toksyny hemolitycznej oraz białka PhlB związanego z fosfolipazą A. Szczep ten nie posiadał genów kodujących białko ShlB toksyny hemolitycznej i białko PhlA fosfolipazy A. Podobnie jak poprzednie szczepy *S. liquefaciens*, szczep 139dz posiada długi O-swoisty łańcuch LPS i jest oporny na surowicę ludzką (Tab. 32).

Szczep *S. liquefaciens* 120dz został wyizolowany z tuszy dzika euroazjatyckiego i potwierdzono u niego występowanie enzymu deoksyrybonukleazy, lipazy, żelatynazy i hemolizyny. Posiada geny kodujące fimbrie typu I, białko ShlA oraz białka związane z fosfolipazą A. Nie potwierdzono u niego występowania genu ShlB toksyny hemolitycznej. Dodatkowo szczep ten jest wrażliwy na działanie ludzkiej surowicy, pomimo iż wytwarza LPS o długim O-swoistym łańcuchu (Tab. 32).

S. liquefaciens 97dz pozyskano z tuszy dzika euroazjatyckiego. Szczep ten posiada enzymy deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy i nie posiada enzymu hemolizyny. Potwierdzono u niego występowanie genów kodujących fimbrie typu I, białka ShlA, ShlB oraz PhlB i nie potwierdzono występowania genu kodującego białka PhlA. *S. liquefaciens* 97dz ma długi O-swoisty łańcuch LPS i jest średnio-wrażliwy na działanie ludzkiej surowicy (Tab. 32).

Szczep *S. liquefaciens* 3s pozyskany od sarny europejskiej charakteryzował się posiadaniem enzymów lipazy, żelatynazy, hemolizyny i brakiem enzymu deoksyrybonukleazy. Pałeczka ta posiadała fimbrie typu I, białko ShlA oraz białka PhlA i PhlB, co potwierdzono poprzez detekcję genów wirulencji. Jest to również szczep, u którego stwierdzono długi O-swoisty łańcuch LPS oraz oporność na działanie ludzkiej surowicy (tab. 32).

S. marcescens 41śg.2d wyizolowano z jamy nosowo-gardłowej świni domowej. U szczepu tego występują enzymy deoksyrybonukleaza, lipaza i żelatynaza. Z kolei nie potwierdzono u niego enzymu hemolizyny. Nie posiada on również fimbrii typu I oraz białka PhlB fosfolipazy A. Detekcja genów wirulencji wykazała natomiast obecność genów kodujących białka ShlA, ShlB i PhlA. *S. marcescens* 41śg.2d była oporna na ludzką surowicę i miała LPS z długim O-swoistym łańcuchem (Tab. 32).

S. marcescens kg6.2c posiadał enzymy zewnątrzkomórkowe: deoksyrybonukleazę, lipazę, żelatynazę i hemolizynę. Szczep ten miał potwierdzone występowania genów kodujących fimbrie typu I, białko ShlA, PhlA i PhlB, z wyjątkiem genu kodującego białko ShlB. Podobnie jak poprzednie szczepy, *S. marcescens* kg6.2c miał cząsteczkę LPS z długim O-swoistym łańcuchem oraz był oporny na działanie surowicy ludzkiej. Jest to również szczep, którego źródłem jest jama nosowo-gardłowa krowy domowej (Tab. 32).

Szczep *S. marcescens* 52śg.4c pochodził z jamy nosowo-gardłowej świni domowej. Występują u niego enzymy: deoksyrybonukleaza, lipaza i żelatynaza. Natomiast brak u niego enzymu hemolizyny. Szczep ten posiada wszystkie geny dla testowanych czynników wirulencji, czyli fimbrii typu I, toksyny hemolitycznej ShlA i fosfolipazy A. Oprócz tych cech posiada LPS z długim O-swoistym łańcuchem i jest średnio-wrażliwy na działanie ludzkiej surowicy (Tab. 32).

Ostatni scharakteryzowany szczep w pracy doktorskiej to *S. marcescens* ko11.5d wyizolowana z odbytnicy krowy domowej. Posiada on wszystkie badane enzymy zewnątrzkomórkowe (deoksyrybonukleazę, lipazę, żelatynazę, hemolizynę). Z testowanych genów wirulencji posiadał wyłącznie gen kodujący fimbrie typu I oraz gen kodujący białko PhlA fosfolipazy A. *S. marcescens* ko11.5d, mimo iż posiada cząsteczkę LPS z długim O-swoistym łańcuchem LPS, jest oporny na działanie ludzkiej surowicy (Tab. 32).

Scharakteryzowane w tej pracy szczepy *S. liquefaciens* 130dz, 139dz, 120dz, 97dz, 3s, kg40.1d oraz szczepy *S. marcescens* 41śg.2d, kg6.2c, 52śg.4c i ko11.5d zostały zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów, w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

15. Wnioski

Cel 1: Określenie występowania *S. liquefaciens* i *S. marcescens* u dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów domowych i świń domowych.

- Pałeczki z rodzaju *Serratia* należały do jednych z najczęściej izolowanych rodzajów bakterii Gram-ujemnych z tusz dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*).
- Pałeczki *S. liquefaciens* występowały u wszystkich badanych zwierząt wolno żyjących i zwierząt gospodarskich.
- Pałeczki *S. marcescens* zostały wyizolowane z tusz dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*)

Cel 2: Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez aktywność enzymów zewnątrzkomórkowych.

- Izolaty *S. liquefaciens* pozyskane z tusz dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), krów domowych (*Bos taurus taurus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*) wytwarzały enzymy deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy.
- W obrębie gatunku *S. liquefaciens* najczęściej obecność hemolizyny stwierdzano u izolatów od świń domowych (*Sus scrofa domestica*), a najrzadziej u izolatów od krów domowych (*Bos taurus taurus*).
- W obrębie gatunku *S. marcescens* najczęściej enzym hemolizynę wytwarzały izolaty od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), a najrzadziej izolaty od krów domowych (*Bos taurus taurus*).

Cel 3: Określenie potencjalnej wirulencji *S. liquefaciens* i *S. marcescens* poprzez obecność wybranych genów wirulencji.

- Największy odsetek badanych genów wirulencji wśród izolatów *S. liquefaciens* mają izolaty pozyskane z tusz saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i świń domowych (*Sus scrofa domestica*), a najmniejszy odsetek mają izolaty z tusz krów domowych (*Bos taurus taurus*).
- Największy odsetek badanych genów wirulencji wśród izolatów *S. marcescens* mają izolaty z tusz krów domowych (*Bos taurus taurus*), a najmniejszy odsetek izolaty z tusz dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*).

Cel 4: Określenie typu O-swoistego łańcucha LPS wśród izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* pozyskanych od zwierząt gospodarskich i wolno żyjących.

- Wszystkie badane izolaty *S. liquefaciens* i *S. marcescens* miały gładki lipopolisacharyd o zróżnicowanych profilach.

Cel 5: Określenie poziomu oporności izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakteriobójcze działanie surowicy (NHS).

- Wśród izolatów *S. liquefaciens* występowały izolaty oporne, średnio wrażliwe oraz wrażliwe na działanie 50% ludzkiej surowicy.
- Wśród izolatów *S. marcescens* występowały izolaty oporne, średnio wrażliwe oraz wrażliwe na działanie 50% ludzkiej surowicy.

16. Dyskusja

Bakterie z rodzaju *Serratia,* z wyjątkiem *S. marcescens,* są wciąż słabo opisane w literaturze pod względem występowania, czy też detekcji ich czynników wirulencji. Z tego względu niniejszą pracę doktorską można traktować jako wyniki wstępne do prowadzenia dalszych badań nad patogenezą odzwierzęcych pałeczek *Serratia* sp.

Tematyka pracy doktorskiej rozpoczęła również nowy obszar badań w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zakład Mikrobiologii od lat specjalizuje się w tematyce badania oporności na bakteriobójcze działanie surowicy pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Salmonella*, *Yersinia* i *E. coli* [109], ze szczególnym uwzględnieniem w tym procesie wpływu lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej [107,110,111,112]. Dodatkowo prowadzone są badania wyjaśniające w tym procesie rolę obecności kwasu sjalowego w strukturach powierzchniowych, w generowaniu oporności bakterii Gram-ujemnych na bakteriobójcze działanie surowicy [107]. Kolejną tematyką zakładu jest detekcja genów kodujących czynniki wirulencji bakterii Gram-ujemnych (*Salmonella* sp., *Yersinia* sp. i *E. coli*) wraz z nawiązaniem do źródła ich izolacji. Zakład Mikrobiologii prowadzi również różnorodne prace w tematyce m. in. nanocząstek srebra [113,114], biofilmu bakteryjnego [115,116] oraz badań białek błony zewnętrznej. Głównym przedmiotem badań Zakładu Mikrobiologii są bakterie Gram-ujemne reprezentowane przez *Escherichia coli* [117,112], *Salmonella* sp. [118,119] oraz *Yersinia enterocolitica* [120]. Rozpoczęte w niniejszej pracy doktorskiej badania poszerzają zakres badań Zakładu o dwa nowe gatunki - *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens*.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej są kontynuacją badań rozpoczętych w ramach realizacji pracy magisterskiej Doktorantki [108]. Przyczyną rozpoczęcia badań nad występującymi u zwierząt pałeczkami *Serratia* sp., było wstępne poszukiwanie u dzików euroazjatyckich i saren europejskich pałeczek *Y. enterocolitica*. Prowadzone w ramach pracy magisterskiej badania pozwoliły na stworzenie dodatkowo kolekcji różnorodnych gatunków bakterii Gram-ujemnych, które zdecydowanie przeważały nad ilościowym występowaniem *Y. enterocolitica* u badanych zwierząt. Dlatego też, podjęto decyzję o rozsze-rzeniu tematyki badań w kierunku oceny bioróżnorodności bakteryjnej Gram-ujemnej mikroflory górnego odcinka przewodu pokarmowego dzików euro-azjatyckich i saren europejskich. Uzyskane wyniki pokazały, że jednym z najczęściej występujących rodzajów bakterii identyfikowanych u dzików i saren był rodzaj *Serratia*. Dlatego też, po analizie danych literatury na temat rodzaju *Serratia*, podjęto decyzję o przeprowadzeniu badań dotyczących charakterystyki obecności wybranych czynników wirulencji u *S. marcescens* i *S. liquefaciens*, co wzbogaciło dotychczasową wiedzę, z zakresu nauk

biologicznych, o nowe informacje charakteryzujące rodzaj *Serratia* występujący u zwierząt wolno żyjących oraz u zwierząt gospodarskich.

Temat niniejszej pracy doktorskiej prezentowany był na szeregu konferencji o zasięgu zarówno krajowym jak i międzynarodowym. Po raz pierwszy tematykę pracy doktorskiej zobrazowano w postaci posteru pt.: „Game animals as a source of *Serratia* sp. - an opportunistic pathogen for humans" na konferencji krajowej „3rd Wroclaw Scientific Meetings" w 2019 roku [121]. Na konferencji tej przedstawiono obecność różnych gatunków w obrębie rodzaju *Serratia* występujących w jamie nosowo-gardłowej dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) i saren europejskich (*Capreolus capreolus*). Na kolejnej konferencji „VI Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią" w 2021 roku zaprezentowano temat „Charakterystyka patogenności odzwierzęcych pałeczek z rodzaju *Serratia*" publikując wyniki dotyczące detekcji genów kodujących fimbrie typu I, fosfolipazę A i toksynę hemolityczną ShlA u odzwierzęcych pałeczek *Serratia* sp. [122]. Na międzynarodowej konferencji European Culture Collections' Organisation (ECCO) w 2021 roku zaprezentowano temat „Comparative analysis of Gram-negative bacteria isolated from farm animals on the example of pigs (*Sus scrofa domestica*) and cows (*Bos taurus taurus*) in Poland" [123] przedstawiając wyniki identyfikacji MALDI izolatów bakteryjnych pozyskanych od krów domowych i świń domowych uwzględniając rodzaj *Serratia*. Zaprezentowany poster zdobył drugą nagrodę w organizowanym międzynarodowym konkursie. Tematyka pracy doktorskiej był również opublikowany na konferencji European Culture Collections' Organisation (ECCO) w 2022 roku w postaci posteru pt. „Virulence potential of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* strains isolated from selected animals" [124].

Wszystkie organizmy żywe kolonizowane są przez różnego rodzaju mikroorganizmy. Najczęściej bakterie te można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Są nimi bakterie saprofityczne oraz bakterie patogenne. Wśród bakterii zasiedlających zwierzęta możemy wyróżnić grupę bakterii o potencjale zoonotycznym, która stanowi bardzo ważny aspekt w kontekście zdrowia publicznego. Jak podaje Gliński Z. i Kostro K. [125] bakterie zoonotyczne, w przeciwieństwie do bakterii saprofitycznych, stają się częścią mikroflory zwierząt wyłącznie okresowo. Bakterie o potencjale zoonotycznym stanowią zagrożenie nie tylko dla konsumenta, ale w równym stopniu stają się zagrożeniem dla weterynarzy, rzeźników, leśników oraz myśliwych, którzy mają bezpośredni kontakt ze zwierzęciem. Bardzo ważnym aspektem w kontekście zoonoz wydaje się być środowisko, w którym żyją zwierzęta będące rezerwuarem zoonotycznych bakterii. W takiej sytuacji bakterie występujące u zwierząt przedostają się do środowiska, a następnie mogą stać się zagrożeniem dla ludzi. Źródłami infekcji bakteriami zoonotycznymi jest przeważnie kontakt bezpośredni z żywymi zwierzętami lub też bezpośredni kontakt z tuszami zwierząt, produktami mięsnymi wytworzonymi ze skolonizowanych zwierząt, środowiskiem, a w szczególności z wodą, roślinami i glebą skażonymi przez zwierzęta. Dla osób pracujących lub przebywających w bliskim kontakcie ze zwierzętami pełniącymi funkcję

rezerwuarów bakterii zoonotycznych bardzo ważną grupą chorób odzwierzęcych - zoonoz są zoonozy bezpośrednie. Do ich wystąpienia wystarczy bezpośredni kontakt z zarażonym zwierzęciem, ich tuszą lub też produktami pochodzącymi z rozbioru tusz, bądź też moczem i krwią. Przykładami chorób odzwierzęcych, którymi można się zarazić w ten sposób są listerioza, bruceloza i salmonelloza [125,126].

Zwierzęta wolno żyjące i zwierzęta gospodarskie, których materiał mikrobiologiczny badano w niniejszej pracy doktorskiej można zaliczyć do zwierząt o największym potencjale rezerwuaru dla różnego rodzaju bakterii zoonotycznych. Dzik euroazjatycki (*Sus scrofa*) jak podaje Gliński Z. i wsp. jest rezerwuarem dla *Brucella suis, Mycobacterium bovis, Coxiella burnetii, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Leptospira* sp. oraz *Salmonella* sp. Niektóre z wymienionych powyżej bakterii należą do trzeciej grupy pod względem patogenności, czyli są to bakterie wywołujące choroby o bardzo ciężkim przebiegu. Są nimi *Brucella suis* odpowiedzialna za brucelozy, *Mycobacterium bovis* wywołujący odzwierzęcą gruźlicę oraz *Coxiella burnetii*, która jest czynnikiem etiologicznym gorączki Q [125].

Sarna europejska (*Capreolus capreolus*) jest kolejnym rezerwuarem dla różnego rodzaju bakterii zoonotycznych. W pracy Gliński Z. i wsp. przedstawiono, iż zwierzęta te są rezerwuarami dla bakterii *Borrelia burgdorferi sensu lato, Mycobacterium paratuberculosis, Erlichia* sp., *Mycobacterium bovis, Coxiella burnetii, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Leptospira* sp., *Salmonella* sp. oraz *Bacillus anthracis*. Bakterie te odpowiedzialne są za wywoływanie schorzeń o ciężkim przebiegu takich jak: borelioza, choroba Johnego zwana również paratuberculozą, erlichioza, gruźlica odzwierzęca, gorączka Q, jersinioza, kampylobakterioza, leptospiroza, salmonellozy oraz wąglik [125].

U świń domowych (*Sus scrofa domestica*) również wykazano występowanie bakterii będących poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Pełnienie funkcji rezerwuaru przez świnie domowe potwierdzono dla *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* oraz *Yersinia enterocolitica* [127].

Bakterie występujące u bydła to kolejna grupa bakterii mogąca wywoływać poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W przypadku bakterii występujących u bydła kolejnym sposobem zarażenia się jest spożycie niepasteryzowanego mleka lub sam kontakt z surowym mlekiem. Według opublikowanej w 2014 roku pracy McDaniel C.J. i wsp. występującymi u bydła bakteriami o wysokim potencjale patogenności są: *Bacillus anthracis, Actinobacillus ligniersii, Borrelia burgdorferi, Arcanobacterium pyogenes, Coxiella burnetii, Brucella abortus, Brucella melitensis, Clostridium difficile, Burkholderia pseudomallei, Dermatophilus congolensis, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella* sp., *Leptospira* sp., *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Staphylo-*

coccus aureus, Shigella sp., *Streptococcus* sp., *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia enterocolitica* [128].

Przedstawione powyżej zestawienie bakterii zoonotycznych u dzików, saren, świń oraz u bydła pokazują, że rodzaj *Serratia* nie jest wymieniany jako bakterie o potencjale zoonotycznym. Jednakże taka sytuacja może być powodem braku badań pokazujących potencjał wirulencji tych bakterii izolowanych od zwierząt.

Próby ustalenia mikroflory zwierzyny wolno żyjącej zostały opisane m. in. w 2011 roku przez naukowców z Brazylii Lessa S. S., i wsp. [129] w opublikowanej przez nich pracy zostały przedstawione rodzaje bakterii wyizolowane z różnych części ciała dzików euroazjatyckich. W kontekście prowadzonych badań w niniejszej pracy doktorskiej najbardziej interesującym wydaje się być porównanie rodzajów bakterii pomiędzy dwoma prowadzonymi eksperymentami. Lessa S. S. i wsp. [78] prowadząc ogólne badania stwierdzające obecności w jamie ustnej zarówno bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, udowodnili występowanie rodzajów takich jak *Bacillus, Acinetobacter, Yersinia, Proteus, Citrobacter, Ewingella* oraz *Kocuria, Enterococcus* i *Staphylococcus*. Z kolei własne badania wyizolowanych szczepów z wymazów gardła i migdałków wykazały obecność *Aeromonas* sp., *Citrobacter* sp., *Erwinia* sp., *Ewingella* sp., *Morganella* sp., *Providencia* sp., *Shewanella* sp., *Yersinia* sp., *Rahnella* sp. oraz ***Serratia* sp**. Pomiędzy wynikami identyfikacji materiału pozyskanego od dzików można zaobserwować podobieństwo, które dotyczy rodzajów *Citrobacter, Ewingella* oraz *Yersinia*. Ze względu na zakładany cel prac kierujący izolację bakterii wyłącznie na bakterie Gram-ujemne, nie jest możliwe całkowite porównanie wyników badań. Dodatkowo uzyskane wyniki badań dotyczą jedynie izolatów z górnego odcinka przewodu pokarmowego, co również ogranicza możliwość porównania izolatów z pozostałymi badaniami.

Wśród zwierząt hodowlanych prawdopodobnie najlepiej poznaną mikroflorę ma świnia domowa. W pracach Lowe B. A. i wsp. [129], Mann E. i wsp. [130], Kernaghan S i wsp. [131] oraz Baele M. i wsp [132] została przedstawiona mikroflora górnego odcinka przewodu pokarmowego świń domowych. W jej skład zaliczane są bakterie z rodzajów: *Actinobacillus, Actinomyces, Arcanobacterium, Campylobacter, Citrobacter, Enterobacter, Enterococcus, Escherichia, Haemophilus, Lactobacillus, Klebsiella, Mycobacterium, Listeria, Mycoplasma, Proteus, Pasteurella, Providencia, Salmonella, Rothia, Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Yersinia, Bacteroides, Treponema, Pseudomonas* oraz m. in. *Clostridium* [129-132]. W pracy doktorskiej Gram-ujemna mikroflora jamy nosowo-gardłowej pochodzących z tusz świń częściowo pokrywała się z powyżej wymienionymi rodzajami bakterii. Podobieństwa te dotyczyły rodzajów *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas* oraz *Yersinia*. Uzyskanymi wynikami wykazano również występowanie wcześniej nie udokumentowanych rodzajów bakterii *Aeromonas, Hafnia, Raoultella* oraz *Shewanella*.

Zbadana przez Isaacson R. i wsp. w 2012 roku mikroflora przewodu pokarmowego świń domowych pokazuje dużą różnorodność rodzajów bakterii. Według przeprowadzonych przez autorów pracy badań mikroflora przewodu pokarmowego świń domowych reprezentowana jest m. in. przez bakterie z rodzajów: *Bacillus, Clostridium, Prevotella, Streptococcus, Propionibacterium, Butyvibrio, Ruminococcus, Lactobacillus, Actinobacillus, Megasphaera, Coprococcus, Eubacterium* oraz *Helicobacter* [133]. Porównując przedstawione rodzaje bakterii opisywane w podanej pracy, Gram-ujemna mikroflora odbytnicy badanych świń domowych zawiera rodzaje bakterii takie jak: *Aeromonas, Citrobacter, Escherichia, Pseudomonas,* ***Serratia*** oraz *Shewanella*.

Mikroflora górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego została również opisana dla krowy domowej. Jak podano w pracy zbiorowej Xu Q. i wsp. w 2021 roku oraz w pracy Lim S.-K. i wsp. w 2020 roku w dolnym odcinku przewodu pokarmowego krów, w szczególności w jelitach, możemy spotkać bakterie z rodzajów: *Clostridium, Ruminococcus, Fibrobacter, Eubacterium, Prevotella, Butyvibrio, Treponema, Anaerovibrio, Streptococcus, Rumibacter, Lactobacillus, Megasphera, Bifidobacterium, Alistipes, Enterococcus, Arthrobacter, Subdoligranulum, Pseudomonas, Acinetobacter, Parabacteroides* oraz *Escherichia* [134,135]. Zastosowana metoda izolacji bakterii Gram-ujemnych CT/DNAse pozwoliła na pozyskanie bakterii z rodzajów *Acinetobacter, Escherichia* oraz *Pseudomonas*, które zostały wymienione powyżej jako bakterie mikroflory jelit krów. Jednakże rodzaje te nie stanowiły całości wyników izolacji bakterii z dolnego odcinka przewodu pokarmowego badanych krów. Wyniki izolacji wskazały na występowanie rodzajów bakterii dotąd nie ujętych w kontekście składowych mikroflory jelit krów. Rodzajami tymi były: *Aeromonas, Buttiauxella, Citrobacter, Klebsiella, Morganella, Proteus, Serratia, Shewanella* oraz *Stenotrophomonas*.

W opublikowanej w 2020 roku przez Timsit E. i wsp. [136] pracy przedstawiono skład mikroflory nosogardzieli u krów domowych. Przeprowadzone badania pokazują, że występującymi bakteriami w tym miejscu są bakterie z rodzajów: *Corynebacterium, Pasteurella, Mycoplasma, Psychrobacter, Pseudomonas, Moraxella, Staphylococcus, Shewanella, Histophilus, Solibacillus, Mannheimia, Carnobacterium, Lactococcus, Acinetobacter, Clostridium, Rathayibacter* i *Promicromonospora*. W pracy doktorskiej w jamie nosowo-gardłowej krów domowych udało się zidentyfikować bakterie z rodzajów *Aeromonas, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Kluyvera, Leclercia, Morganella, Pseudomonas, Raoultella, Serratia, Shewanella* oraz *Stenotrophomonas* [136]. **Jak można zauważyć, uzyskane wyniki izolacji w pracy doktorskiej wskazują na występowanie u krów dotąd nie uwzględnionych w literaturze rodzajów bakterii Gram-ujemnych**.

Izolacja wybranej grupy bakterii ze środowisk charakteryzujących się wysoką różnorodnością mikroorganizmów zawsze stwarza pewne problemy i stanowi wyzwanie w planowaniu doświadczeń. Zastosowanie w pracy doktorskiej połączenia podłoża selektywnego CT z podłożem różnicującym

DNAse pozwoliło na zwiększenie możliwości izolacji pałeczek z rodzaju *Serratia* z materiału zwierzęcego o dużej różnorodności. Jednakże pomimo zastosowanego wybiórczego podłoża i podłoża różnicującego z dodatkiem antybiotyków nie otrzymano wzrostu jedynie pałeczek z rodzaju *Serratia*. Zgodnie z informacją podaną dla podłoża selektywnego CT, na podłożu tym możliwy jest wzrost takich bakterii jak: *Pseudomonas, Acinetobacter* oraz *Providencia*. W badaniach prowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej na podłożu CT obserwowano wzrost bakterii z rodzaju *Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Raoultella* i *Kluyvera*.

Metoda MALDI Biotyper staje się od dekady techniką coraz częściej stosowaną w identyfikacji różnego rodzaju mikroorganizmów. Początkowo została stworzona w celu usprawnienia identyfikacji mikroorganizmów pochodzenia klinicznego i przyspieszenia procesu diagnozowania. Jednakże z biegiem czasu technika ta ulega rozwojowi i staje się użyteczna w różnego rodzaju obszarach badań [137,138,139,140,141,142,143,144].

MALDI Biotyper stosowany w mikrobiologii klinicznej pozwala na identyfikację zarówno bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich, mykobakterii oraz grzybów drożdżopodobnych. Jedną z podstaw identyfikacji MALDI jest baza widm mieszaniny białek rybosomalnych dla szczepów referencyjnych. W identyfikacji mikroorganizmów pochodzenia klinicznego baza ta zawiera widma dla ponad 3 tysięcy różnych gatunków bakterii [92].

Baza MALDI Biotyper zaktualizowana w 2021 roku zawiera również widma referencyjne dla gatunków z rodzaju *Serratia*, którymi są: *S. marcescens, S. liquefaciens, S. nematophila, S. grimesii, S. odorifera, S. rubidaea, S. ureilytica, S. quinivorans, S. fonticola, S. ficaria, S. entomophila, S. plymuthica* oraz *S. proteamaculans* [92].

Wykorzystywanie metody MALDI Biotyper w mikrobiologii środowiskowej również podlega ciągłemu rozwojowi. Technika ta jest bardzo ważna dla mikrobiologii środowiskowej, gdyż umożliwia identyfikację bakterii z różnych środowisk i poznanie części mikrobiomu, który możemy wyhodować. Aplikacyjność tej metody m.in. w mikrobiologii środowiskowej opiera się głównie na bazie poszerzonej o dodatkowej widma referencyjne. Baza ta zawiera mikroorganizmy, zarówno pochodzenia klinicznego, jak i pochodzące ze środowiska zewnętrznego. Połączenie to pomaga w dokładniejszej identyfikacji wszystkich mikroorganizmów z identyfikowanej próbki. Przykładami bakterii pochodzenia środowiskowego, które mogą być identyfikowane przez MALDI Biotyper są rodzaje *Vibrio* sp., *Rhodococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas putida, Pseudomonas sp., Achromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Microbacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudoalteromonas* sp. oraz *Arthrobacter* sp. [144].

Metody proteomiczne MALDI znajdują swoje zastosowanie również w badaniach porównawczych białek pomiędzy bakteriami bytującymi na zewnątrz oraz wewnątrz organizmu gospodarza. Takie zastosowanie metody może być pomocne w badaniu patofizjologii procesu infekcji bakteryjnej wykazującej

większą ilość białek u szczepów bakteryjnych bytujących wewnątrz organizmu gospodarza. Tego typu badania prowadzone były przykładowo dla bakterii *Porphyromonas gingivalis, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis* oraz *Salmonella enterica* [146].

W 2015 roku w Polsce opublikowano badania przedstawiające wyniki identyfikacji izolatów bakteryjnych pochodzenia klinicznego i odzwierzęcego, którego źródłem były ptaki. Autorzy pracy jednomyślnie stwierdzili, że zastosowanie metody MALDI do identyfikacji izolatów było bardzo pomocne. Metoda ta była skuteczna w identyfikacji bakterii występujących bardzo rzadko lub też bakterii, które sprawiają pewne trudności w diagnostyce. Przykładami takich bakterii jest gatunek *Aggregatibacter segnis* z próbek klinicznych oraz bakterie z rodziny *Pasteurellaceae* z próbek odzwierzęcych. Ponadto od badanych ptaków za pomocą zastosowanej metody udało się zaklasyfikować uzyskane izolaty do gatunków takich jak: *Enterococcus faecaelis, Enterococcus hirae, Enterococcus gallinarum, Gallibacterium anatis* oraz *Avibacterium endocarditis* i *Pantoea agglomerans* [147].

W identyfikacji bakterii pochodzenia zwierzęcego metoda MALDI została wykorzystana również w pracy opublikowanej w Polsce w 2019 roku przez zespół Wanecka A. i wsp. Izolaty pochodziły z mleka krów cierpiących na zapalenie wymienia i kolekcjonowane były w latach 2013-2016. Opublikowane doświadczenie zostało prowadzone w kierunku bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Identyfikacja bakterii pozwoliła na przyporządkowanie 131 izolatów do 18 różnych gatunków, którymi są m. in. *S. warneri, S. fleurettii, S. vitulinus, S. cohni, S. rostri, S. chromogenes* oraz *S. microti* [148].

Metoda MALDI Biotyper wykorzystywana jest również w określaniu prewalencji występowania określonych gatunków bakterii u określonych gospodarzy. Przykład określania takiej prewalencji został opisany w pracy Bierowiec K. i wsp. w 2019 roku. Autorzy pracy przedstawili aplikacyjność metody MALDI w ustaleniu bakterii występujących zarówno u zdrowych, jak i u chorych kotów w Polsce. Prowadzone badania pozwoliły na wyłonienie grupy gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus* występujących u zdrowych i chorych kotów. Wśród zdrowych kotów najczęściej identyfikowanymi gatunkami były m. in. *S. felis, S. epidermidis, S. aureus* i *S. warneri*. Z kolei u chorych kotów dominowały gatunki *S. felis, S. haemolyticus* oraz *S. xylosus* [149].

Przykład wykorzystania MALDI Biotyper w identyfikacji bakterii od zwierząt został przedstawiony dla pałeczek *Y. enterocolitica* w 2018 roku izolowanych od m. in. świń i dzików [150]. Kolejne przykłady identyfikacji tej bakterii od zwierząt metodą MALDI prezentują m.in. prace Råsbäck T. i wsp. w 2018 roku [151], Stamm I. i wsp. w 2013 roku [152], Rouffaer L.O. i wsp. 2017 roku [153] pokazujące występowanie *Y. enterocolitica* u świń [151], kotów i psów [152] oraz u koni [153].

Techniki proteomiczne MALDI Biotyper są również użyteczne w ustalaniu częstości występowania określonego gatunku mikroorganizmu wśród różnych zwierząt. Przykładem takich prac jest publikacja Florek M. i wsp. z 2021 roku.

Tematem badań były *Cryptococcus neoformans* i *Cryptococcus gattii* występujące na terytorium Polski. Dzięki zastosowanej metodzie identyfikacji potwierdzono występowanie *C. neoformans* różnych wariantów u gołębia domowego, kota, papugi, lemura oraz u pawia [154].

Oprócz wykorzystania metody MALDI Biotyper w identyfikacji bakterii pochodzenia zwierzęcego, metoda ta może być użyteczna w oznaczaniu mikroflory bakteryjnej roślin. W 2021 roku w Polsce została opublikowana praca ze współautorstwem Doktorantki, pokazująca wykorzystanie metody MALDI Biotyper w identyfikacji mikroflory storczyków z gatunku *Epipactis albensis, E. helleborine* i *E. purpurata*. Praca ta pokazuje szeroką gamę bakterii środowiskowych zidentyfikowanych omawianą metodą. Od storczyków zidentyfikowano bakterie z rodzaju *Bacillus* (*B. weihenstephanensis, B. mycoides, B., thuringiensis, B. cereus*), *Clostridium* sp. (*C. bifermentans, C. baratii, C. perfringens, C. sardiniense, C.sordellii*), *Terrisporobacter* sp., *Lysinibacillus* sp. (*L. fusiformis, L. sphaericus*), *Paenibacillus* sp. (*P. amylo-lyticus*), *Pseudomonas* sp. (*P. fluorescens, P. chlororaphis, P. grimontii, P. extremorientalis*), *Pantoea* sp. (*P. agglomerans*), *Rhodococcus* sp. (*R. erythropolis*), *Raoultella* sp. (*R. ornithinolytica*), *Viridibacillus* sp., *Solibacillus* sp. i *Stenotrofomonas* sp. oraz z gatunku *S. liquefaciens, E. americana* oraz *E. billingiae* [77].

Metoda MALDI Biotyper znajduje swoje zastosowanie także w identyfikacji bakterii bezpośrednio z hodowli krwi. Występowanie różnego rodzaju składników krwi nie zakłóca identyfikacji mikroorganizmów, co jest bardzo obiecującą perspektywą w szybkim procesie diagnostycznym w szpitalach. Jednakże pomimo perspektywicznego wykorzystania tej metody ma ona swoje ograniczenia. Pierwszym ograniczeniem jest niemożliwość identyfikacji jednocześnie tzw. kultur mieszanych. W przypadku występowania kilku różnych gatunków mikroorganizmów wynik analizy będzie niejednoznaczny. Wynik analizy zawierać będzie informację tylko o jednym z gatunków występującym we krwi, a raport nie wskaże o sytuacji występowania więcej niż jednego gatunku bakterii. Kolejnym poważnym ograniczeniem metody identyfikacji bakterii z krwi jest występowanie niższej jakość otrzymywanych widm analizowanego materiału, co może oznaczać ryzyko błędu w procesie identyfikacji. Ostatnim deklarowanym ograniczeniem metody jest ograniczenie wydajności identyfikacji dla bakterii z rodzajów: *Aeromonas, Acinetobacter, Burholderia, Citrobacter, Gemella, Corynebacterium, Haemophilus, Klebsiella, Neisseria, Listeria, Salmonella, Staphylococcus, Serratia, Streptococcus, Yersinia* i grzybów drożdżopodobnych *Candida* sp [92].

Metoda proteomiczna MALDI Biotyper może być również zastosowana w diagnostyce mykologicznej. Jednakże wykorzystanie tej metody w mykologii ewoluowało zdecydowanie wolnej w porównaniu do identyfikacji bakterii, czego główną przyczyną jest większa złożoność budowy grzybów w porównaniu do bakterii. Całość identyfikacji grzybów za pomocą MALDI ma dużo uwarunkowań, które znacząco mogą wpływać na jakość identyfikacji. Do takich

czynników wpływających na identyfikację należą stosowane podłoże do hodowli grzybów, czas inkubacji, zastosowanie specjalnej procedury ekstrakcji białek oraz biblioteka widm referencyjnych [155].

Metoda MALDI Biotyper wybrana do identyfikacji pozyskanych w pracy doktorskiej izolatów pomogła w oznaczeniu zdecydowanej większości izolatów. Dzięki tej metodzie udowodniono występowanie u badanych zwierząt Gram-ujemnych pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens*. Dodatkowo wykazano obecność innych Gram-ujemnych bakterii, w tym z rodzajów m.in. *Pseudomonas, Rahnella, Aeromonas, Citrobacter* oraz *Klebsiella*.

Podawane przez Celejewski-Marciniak i wsp. występowanie u bakterii z rodzaju *Serratia* enzymów zewnątrzkomórkowych deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy to jedna z cech charakterystycznych dla rodzaju *Serratia,* z wyjątkiem gatunku *S. fonticola*. Jednakże uzyskane w pracy wyniki dotyczące analizy enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy u odzwierzęcych *S. liquefaciens* i *S. marcescens* są odmienne od danych prezentowanych przez Celejewski-Marciniak et al. w 2011 roku [6]. Niektóre z izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* pozyskane od dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów domowych i świń domowych nie posiadały omawianych enzymów. Otrzymane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki detekcji enzymów deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy u *S. liquefaciens* i *S. marcescens* wyizolowanych od zwierząt można uznać za pierwsze takie typu badania dla tej grupy bakterii. Ze względu na prawdopodobnie po raz pierwszy w ten sposób zestawione badania aktywności enzymu deoksyrybonukleazy, lipazy i żelatynazy dla izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* można uznać je za przykład określania potencjału wirulencji tych bakterii izolowanych z różnych źródeł.

Określanie wirulencji bakterii z rodzaju *Serratia* izolowanych od zwierząt, poprzez molekularną detekcję genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, nie jest dotychczas techniką standardowo wykonywaną w badaniach tych bakterii. Potwierdza to fakt braku szczepów kontrolnych zawierających opisane występowanie określonych genów wirulencji oraz opisywany w pracy fakt samodzielnego wypracowania szczepów kontrolnych *S. marcescens* PCM 501, PCM 549 oraz *S. liquefaciens* PCM 2830. Pozyskane w pracy doktorskiej wyniki detekcji genów wirulencji mogą być materiałem do prowadzenia dalszych badań poszerzających ogólną wiedzę na temat tej grupy bakterii. Zestawienie detekcji genu kodującego fimbrie typu I, białka toksyny hemolitycznej ShlA oraz białka fosfolipazy A jest prawdopodobnie pierwszym takich badaniem wykonanym dla izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* pozyskanych od dzików, saren, krów i świń.

Charakterystyka długości O-swoistego łańcucha LPS, jako jednego z czynników wirulencji u bakterii Gram-ujemnych, izolatów *S. marcescens* i *S. liquefaciens* jest bardzo słabo opisana w literaturze. Opublikowana w 1988 roku praca Michael A. i wsp. pokazuje zestawienie obrazu O-swoistego łańcucha LPS. W publikacji przedstawiono m. in. zestawienie wyników analizy LPS dla 71 klinicznych izolatów *S. marcescens*. Wszystkie izolaty miały długi O-swoisty

łańcuch LPS o zróżnicowanych obrazach [156]. W 1990 roku opublikowano pracę, w której przedstawiono wyniki elektroforezy SDS-PAGE 29 izolatów *S. marcescens* pozyskanych od pacjentów. Wyniki analizy pokazały różnorodność w uzyskanych obrazach, a wszystkie izolaty miały długi O-swoisty łańcuch LPS [157]. Dla *S. liquefaciens* izolowanej z różnych źródeł nie znaleziono danych literatury przedstawiających analizę O-swoistego łańcucha LPS.

Lipopolisacharyd jest jednym z czynników wirulencji bakterii odgrywającym istotną rolę w oporności bakterii Gram-ujemnych na działanie układu immunologicznego organizmu gospodarza [60]. Zależność pomiędzy długością O-swoistego łańcucha LPS, a opornością bakterii na działanie ludzkiej surowicy pokazał zespół Grossman'a i wsp. w 1987 roku [158]. Wykazali oni, iż wraz ze zwiększaniem się długości O-swoistego łańcucha w cząsteczce LPS zwiększała się przeżywalność szczepu w surowicy. Badania przez nich prowadzone sprawdzały dodatkowo różne parametry LPS-u, wiążąc je z opornością szczepu na surowicę. Prowadzone eksperymenty pokazały, że nie tylko długi O-swoisty łańcuch LPS warunkuje oporność na ludzką surowicę. Istotnym czynnikiem jest również stopień zagęszczenia cząsteczek LPS-u na powierzchni komórki bakterii [158]. W 2020 roku [159] prowadzono badania określające wpływ O-swoistego łańcucha LPS, a opornością *E. coli* na układ dopełniacza. Uzyskane wyniki wykazały występowanie gładkiego typu LPS u wszystkich trzech badanych szczepów *E. coli* oraz oporność większości szczepów na ludzką surowicę. Brak oporności wszystkich szczepów na surowicę, przy obecnym długim O-swoistym łańcuchu LPS, naukowcy wytłumaczyli wykorzystaniem przez szczepy innych mechanizmów warunkujących oporność na surowicę [159]. Zależność pomiędzy długim O-swoistym łańcuchem LPS, a opornością na ludzką surowicę stwierdzono również u *Proteus mirabilis* w pracy Kaca W. i wsp. w 2009 roku. Szczepy posiadające długi O-swoisty łańcuch były oporne na działanie surowicy, w przeciwieństwie do tych z krótkim O-swoistym łańcuchem LPS [160]. Podobną zależność zaobserwowano dla rodzaju *Salmonella* sp. [107].

Oporność na działanie ludzkiej surowicy (NHS) jest jednym z najbardziej istotnych czynników wirulencji bakterii chorobotwórczych. W pracy przeglądowej Futoma-Kołoch B. i wsp. [73] przedstawiono przykłady mechanizmów oporności wybranych gatunków bakterii na działanie układu dopełniacza. Jak podają autorki pracy, Gram-ujemna dwoinka *N. gonorrhoae* posiada zdolność zmiany antygenowości swoich struktur powierzchniowych. Prawdopodobnie dzieje się to na wskutek sjalizacji LOS, co powoduje zmniejszenie rozpoznawania bakterii przez kolektynę MBL i przeciwciała [161]. Na poziom oporności szczepów bakteryjnych na bakteriobójcze działanie surowicy wpływa prawdopodobnie również grubość otoczki. U otoczkowej *K. pneumoniae* zaobserwowano różnicę w rodzajach dróg aktywacji układu dopełniacza. Szczepy otoczkowe aktywowały jedynie drogę alternatywną, a szczepy pozbawione otoczki aktywowały drogi alternatywą, klasyczną oraz lektynową [162]. Mechanizmem oporności na działanie surowicy u bakterii Gram-ujemnych może być też produkcja inhibitorów lizozymu. Takie działanie zaobserwowano u *E. coli*

i *Salmonella* Enteritidis. U *E. coli* zidentyfikowano białko Ivy, które działa na lizozym typu c i g u kręgowców. Z kolei u *S.* Enteritidis wykryto obecność białka Plic, które wykazywało działanie inhibujące jedynie na muramidazę typu c. U bakterii *P. aeruginosa* oporność na surowicę determinowana jest przez m.in. proteinazy. Występująca u *P. aeruginosa* elastaza degraduje białka układu dopełniacza [163]. Aktywność proteolityczną wobec białek układu dopełniacza wykazują również *Proteus* sp., *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* i *H. influenzae*. Działanie to opiera się m.in. na wytwarzaniu metaloproteinaz powodujących rozkład IgA oraz IgG [73].

W 1990 roku opublikowano badania 29 izolatów klinicznych *S. marcescens* testowanych pod względem ich oporności na ludzką surowicę. Przeprowadzone badanie wykazało występowanie trzech typów izolatów *S. marcescens* pod względem stopnia wrażliwości lub oporności na bakteriobójcze działanie surowicy. Na podstawie uzyskanych wyników wyszczególniono szczepy *S. marcescens* oporne na surowicę, szczepy wrażliwe na surowicę oraz szczepy ze zwiększającą się opornością na surowicę wraz ze wzrostem czasu kontaktu szczepu z surowicą. Wśród badanych szczepów *S. marcescens* izolowanych z przypadków posocznic stwierdzono występowanie zarówno opornych jak i wrażliwych izolatów. Ponadto autorzy pracy stwierdzili występowanie szczepów *S. marcescens* z długim O-swoistym łańcuchem LPS jednocześnie wrażliwych na działanie surowicy, co wskazuje, że LPS nie jest jedynym czynnikiem determinującym oporność na układ dopełniacza u pałeczek *Serratia* sp. [157].

Wyniki wpływu bakteriobójczej surowicy ludzkiej na izolaty *S. marcescens* i *S. liquefaciens* uzyskane w pracy doktorskiej pokrywają się z wynikami opisanymi powyżej. Odzwierzęce izolaty *S. marcescens* i *S. liquefaciens* wykazywały zróżnicowanie poziomu oporności na 50% NHS. Zaobserwowano występowanie izolatów całkowicie wrażliwych i opornych na surowicę oraz takich, których narastającą oporność zaobserwowano w kolejnych godzinach inkubowania komórek bakterii z surowicą. Jednakże pomimo różnorodnego poziomu wrażliwości *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na działanie ludzkiej surowicy, wszystkie te izolaty posiadały długi O-swoisty łańcuch LPS.

Pałeczki z rodzaju *Serratia* nie są wyłącznie postrzegane jako oportunistyczne patogeny człowieka. Są to również bakterie o wysokim potencjale wpływania na wzrost roślin. Bakterie te należą do grupy bakterii promujących wzrost roślin (ang. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, PGPR). *S. marcescens* wykazuje działanie pestycydowe zwalczając patogeny roślinne *Rhizoctonia* sp. i *Fusarium oxysporium*. Z kolei gatunek *S. liquefaciens* jest wykorzystywany do ochrony korzeni goździków. Bakteria ta powoduje również zwiększenie ilości brodawek i wiązanie azotu u roślin brodawkowych. Jest również czynnikiem zwiększającym odporność pomidora na choroby grzybicze wywołane przez *Alternaria alternata* [164].

Bakterie z rodzaju *Serratia* są powszechnie rozpoznawane przez produkcję czerwonego barwnika zwany prodigiozyną. W ostatnich latach zyskała ona dużą uwagę ze względu na szeroki zakres działań biologicznych, szczególnie przez

właściwości przeciwmalaryczne, przeciwgrzybicze oraz właściwości antybakteryjne i przeciwnowotworowe. Udowodniono, że większa aktywność antybakteryjna prodigiozyny występuje względem bakterii Gram-dodatnich takich jak: *S. saphrophyticus, S. aureus, E. avium, S. pyogenes* oraz *B. subtilis*. Jednakże aktywność tego barwinka wykazano również dla kilku gatunków bakterii Gram-ujemnych: *P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae, K. aerogenes* i *P. mirabilis*. Prodigiozyna wykazuje właściwości przeciwgrzybicze wobec m.in. *Fusarium oxysporum, Penicillium notatum* czy *Aspergillus flavus*. Czerwony barwnik pałeczek *Serratia* sp. wykazuje również właściwości przeciwmalaryczne oddziałując na zarodźca malarii *Plasmodium falciparum*. Wykazano również aktywność prodigiozyny przeciwko kilku gatunkom pasożytów, np.: *Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum* i *Schistosoma mansoni*. Prodigiozyna może być również stosowana jako jeden z naturalnych środków owadobójczych przeciwko karaluchom, termitom oraz mrówkom tropikalnym. Jednym z najbardziej obiecujących zastosowań aplikacyjnych prodigiozyny jest wykorzystanie jej właściwości antynowotworowych [165]. Prodigiozyna może być wykorzystywana w przemyśle spożywczym jako dodatek do soku truskawkowego [166] lub też jako naturalny barwnik przy produkcji świec [167].

Bakterie z rodzaju *Serratia* to mikroorganizmy o bardzo szerokim potencjale. Z jednej strony to bakterie promujące wzrost roślin, wytwarzające związki, które stosowane są w zwalczaniu innych mikroorganizmów, lub też są wykorzystywane w przemyśle. Z drugiej strony zaś to bakterie będące oportunistycznymi patogenami ludzi oraz zwierząt. Są odpowiedzialne za różnego rodzaju infekcje, w tym infekcje szpitalne oraz te spowodowane bezpośrednim kontaktem ze zwierzętami. Pałeczki *Serratia* sp. występują w wodzie, glebie, na powierzchniach roślin oraz wewnątrz organizmów żywych. W związku z tym bardzo ważna jest potrzeba ich monitorowania, gdyż mogą być przyczyną zachwiania równowagi Jednego Zdrowia (ang. *One Health*). Przedmiotem zainteresowania koncepcji Jednego Zdrowia są m. in. bakterie zoonotyczne w szczególności *Salmonella* sp., *Escherichia coli, Campylobacter* sp., *Staphylococcus aureus* oraz *Yersinia enterocolitica*. Jednakże niniejsza praca doktorska pokazuje, iż należy zwrócić także uwagę na pomijane w tych zestawieniach oportunistyczne patogeny człowieka z rodzaju *Serratia*. Przedstawione w pracy informacje pokazują potencjał patogenności *Serratia* sp. wobec ludzi, zwierząt oraz ich bytowanie w otaczającym nas środowisku. Zebrane dane oraz wyniki dają podstawę do stwierdzenia, że rodzaj *Serratia* również można zaliczyć do bakterii o potencjale zoonotycznym.

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wpływają na rozwój dyscypliny nawuki biologiczne poprzez poszerzenie wiedzy na temat źródeł izolacji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* oraz wykazanie panelu czynników wirulencji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* izolowanych od zwierząt. Przedstawione w pracy doktorkiej izolaty z gatunku *S. liquefaciens* i *S. marcescens* są cenną bazą do dalszych badań nad bakteriami z tych gatunków.

17. Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Serratia* to Gram-ujemne pałeczki należące do grupy oportunistycznych patogenów człowieka. Infekcje *S. liquefaciens* i *S. marcescens* u ludzi mogą być przyczyną chorób takich jak: zapalenie wsierdzia, stawów, opon mózgowo-rdzeniowych, infekcji dróg moczowych czy bakteriemii, których rozwój może być rezultatem bezpośredniego kontaktu ze zwierzętami. Pałeczki te, wśród zwierząt mogą wywoływać posocznicę, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie płuc, wsierdzia lub opon mózgowo-rdzeniowych. Za zmiany chorobowe odpowiedzialne są czynniki wirulencji *Serratia* tj. fimbrie typu I, toksyna hemolityczna ShlA, fosfolipaza PhlA, lipopolisacharyd (LPS), niektóre enzymy w ym proteazy, deoksyrybonukleaza, lipaza oraz żelatynaza.

Celami pracy doktorskiej było opracowanie metodologii izolacji materiału odzwierzęcego w kierunku pałeczek *Serratia* sp. oraz określenie występowania *S. liquefaciens* i *S. marcescens* u dzików, saren, krów i świń. Kolejnym etapem było określenie potencjalnej wirulencji poprzez detekcję enzymów zewnątrzkomórkowych, wybranych genów wirulencji oraz określenie długości O-swoistego łańcucha LPS i stopnia przeżywalności w surowicy.

Cele pracy zrealizowano poprzez zadania badawcze takie jak izolacja i identyfikacja bakterii Gram-ujemnych z wymazów mikrobiologicznych tusz dzików euroazjatyckich, saren europejskich, krów i świń domowych (izolacja na podłożach CT i DNAse, metoda MALDI Biotyper); detekcja enzymów zewnątrzkomórkowych izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* (hodowla na podłożach DNAse, lipase i gelatinase agar)*;* identyfikacja wybranych genów wirulencji u izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* (technika PCR); charakterystyka długości O-swoistego łańcucha LPS izolatów *S. liquefaciens* i *S. marcescens* (SDS-PAGE) oraz analiza wrażliwości *S. liquefaciens* i *S. marcescens* na bakteriobójcze działanie ludzkiej surowicy.

Wyniki badań potwierdziły występowanie pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* u dzików, saren, krów oraz świń. Obecność enzymów zewnątrzkomórkowych i genów kodujących fimbrie typu I, toksynę hemolityczna ShlA i fosfolipazę stwierdzono dla większości izolatów. Wszystkie izolaty *S. liquefaciens* i *S. marcescens* posiadają długi O-swoisty łańcuch LPS. Ponadto, większość izolatów jest oporna na działanie ludzkiej surowicy.

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej mają wpływ na rozwój dyscypliny nauki biologiczne poprzez poszerzenie wiedzy na temat źródeł izolacji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* oraz określenie potencjalnych czynników wirulencji pałeczek *S. liquefaciens* i *S. marcescens* izolowanych od zwierząt.

18. Abstract

Bacteria of the genus *Serratia* are Gram-negative rods considered to be the representatives of human opportunistic pathogens. Infections occurring due to *S. liquefaciens* and *S. marcescens* presence can lead to endocarditis, arthritis, meningitis, urinary tract infections and even bacteraemia. Probably, the development of such infectious disorders in human body is a result of direct contact with animals. Among animals, *Serratia* sp. can be a cause of septicemia, necrotizing fasciitis, pneumonia, endocarditis or meningitis. Fimbriae (type I), lipopolysaccharide (LPS), phospholipase A (PhlA), hemolytic toxin (ShlA) and certain enzymes: (deoxyribonuclease, lipase, gelatinase or proteases) are the factors responsible for virulence of *Serratia* sp. and later development of the disease.

The main goals of this PhD thesis were to develop a methodology for the isolation of *Serratia* sp. from animal material and determine the occurrence of *S. liquefaciens* and *S. marcescens* in wild boars, roe deer, cows and pigs. The next steps included the determination of the potential virulence factors by detecting extracellular enzymes, selected virulence genes, the length of the O-specific chain of LPS and survivability in serum.

The achievement of the above-mentioned goals was possible due to completion of the specific research tasks such as: isolation and identification of Gram-negative bacteria from microbiological swabs from wild boars, roe deer, domestic cows and pigs (CT and DNAse isolation medium, MALDI Biotyper method); detection of extracellular enzymes of *S. liquefaciens* and *S. marcescens* isolates (cultivation on DNAse, lipase and gelatinase agar plates); identification of selected virulence genes in *S. liquefaciens* and *S. marcescens* isolates (Polymerase Chain Reaction); characterization of the length of the O-specific LPS chain of *S. liquefaciens* and *S. marcescens* isolates and analysis of the susceptibility of *S. liquefaciens* and *S. marcescens* to the bactericidal activity of human serum.

The results showed that *S. liquefaciens* and *S. marcescens* were present in the material taken from wild boars, roe deer, cows and pigs. The occurence of extracellular enzymes and genes encoding fimbriae, hemolytic toxin (ShlA) and phospholipase (PhlA) was observed in most of the isolates. Such as resistance to human serum. All of the tested *Serratia* species had a long O-specific LPS chain.

Research results presented in this PhD thesis contribute to the development of biological sciences discipline by broadening the knowledge about the sources of isolation of *S. liquefaciens* and *S. marcescens* and determination of the virulence factors of the aforementioned species isolated from animals.

19. Bibliografia

[1] Adamitom W.B., Almuhairi S., Behravesh C.B., Bilivogui P., Bukachi S.A., Casas N., Becerra N.C., Charron D.F., Chaudhary A., Zanella J.R.C., Cunningham A.A., Dar O., Debnath N., Dungu B., Farag E., Gao G.F., Hayman D.T.S., Khaitsa M., Koopmans M.P.G., Machalaba C., Mackenzie J.S., Markotter W., Mettenleiter T.C., Morand S., Smolenskiy V., Zhou L. (2022) One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. PLOS Pathogens 18: 1-4.

[2] Evans B.R., Leighton F.A. (2014) A history of One Health. Revue scientifique et technique (Internation Office of Epizootics) 33: 413-420.

[3] Dar O., Machalaba C., Adamitom W.B., Almugairi S., Behravesh C.B., Bilivogui P., Bukachi S.A., Casas N., Becerra N.C., Charron D.F., Chaudhary A., Zanella J.R.C., Cunningham A.A., Debnath N., Dungu B., Farag E., Gao G.F., Hayman D.T.S., Khaitsa M., Koopmans M.P.G., Mackencie J.S., Markotter W., Mettenleiter T.C., Morand S., Smolenskiy V., Zhou L. (2022) One Health Theory of Change. One Health High-Level Expert Panel, 1-25.

[4] Zoonotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html, 2022 (dostęp 04.10.2022).

[5] One Health, Centres for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/onehealth/index.html, 2022 (dostęp 04.10.2022)

[6] Celejewski-Marciniak P., Tyski S. (2011) Pałeczki z rodzaju *Serratia*: Charakterystyka gatunków, chorobotwórczość oraz oporność na antybiotyki *Serratia marcescens*. Postępy Mikrobiologii 50: 291-302.

[7] Genus *Serratia*, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia, 2022 (dostęp 10.01.2022)

[8] Rafii F. (2014) Serratia. W: Batt C.A., Tortorello M.L. (red.) Encyclopedia od Food Microbiology: 371-375. https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology#book-info (dostęp 12.12.2022)

[9] Wilhelmi I., Bernaldo De Quirós J.C.L., Romero-Vivas J., Duarte J., Rojo E., Bouza E. (1987) Epidemic Outbreak of *Serratia marcescens* Infection in a Cardiac Surgery Unit. Journal of Clinical Microbiology 25: 1298-1300.

[10] Helvaci O., Hızel K., Guz G., Arinsoy T., Derici U. (2019) A Very Rare Pathogen in Peritoneal Dialysis Peritonitis: *Serratia liquefaciens*. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation 30: 738-740.

[11] Grohskopf L.A, Roth V.R., Feikin D.R., Arduino M.J., Carson L.A, Tokars J.I., Holt S.C., Jensen B.J., Hoffman R.E., Jarvis W.R. (2001) *Serratia liquefaciens* bloodstream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. The New England Journal of Medicine 344: 1491-1497.

[12] Naumiak Ł., Baraniak A., Gniadkowski M., Krawczyk B., Rybak B., Sadowy E., Samet A., Kur J. (2004) Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* in Two Hospitals in Danzig, Poland, over a 5-Year Period. Journal od Clinical Microbiology 42: 3108-3116.

[13] Sunenshine R.H., Tan E.T., Terashita D.M., Jensen B.J., Kacica M.A., Sickbert-Bennett E.E., Noble-Wang J.A., Palmieri M.J., Bopp D.J., Jernigan D.B., Kazakova S., Bresnitz E.A., Tan C.G., McDonald L.C. (2007) A Multistate Outbreak of *Serratia marcescens* Bloodstream Infection Associated with Contaminated Intravenous Magnesium Sulfate from a Compounding Pharmacy. Clinical Infectious Diseases 45: 527-533.

[14] Chuang T.-Y., Chuang C.-P., Cheng H.-H., Hsueh P.-R. (2007) Aortic valve infective endocarditis caused by *Serratia liquefaciens*. Journal of Infection 54: 161-163.

[15] Colombo A.P.V., Magalhães C.B., Hartenbach F.A.R.R., Souto R.M., Silva-Boghossian C.M. (2016) Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. Microbial Pathogenesis 94: 27-34.

[16] Bayramoglu G., Buruk K., Dinc U., Mutlu M., Yilmaz G., Aslan Y. (2011) Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 44: 111-115.

[17] Chiang P.-C., Wu T.-L., Kuo A.-J., Huang Y.-C., Chung T.-Y., Lin C.-S., Leu H.-S., Su L.-H. (2013) Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. International Journal of Infectious Diseases 17: 718-722.

[18] Merino J.L., Bouarich H., Pita M. J., Martínez P., Bueno B., Caldés S., Corchete E., Jaldo M. T., Espejo B., Paraíso V. (2016) *Serratia marcescens* bacteraemia outbreak in haemodialysis patients with tunnelled catheters due to colonisation of antiseptic solution. Experience at 4 hospitals. Nefrologia 36: 667-673.

[19] Ikumapayi U.N., Kanteh A., Manneh J., Lamin M., Mackenzie G.A. (2016) An outbreak of *Serratia liquefaciens* at a rural health center in The Gambia. The Hournal of Infection in Developing Countries 10: 791-798.

[20] Zingg W., Soulake I., Baud D., Huttner B., Pfister R., Renzi G., Pittet D., Schrenzel J., Francois P. (2017) Management and investigation of a *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal unit in Switzerland – the role of hand hygiene and whole genome sequencing. Antimicrobial Resistance and Infection Control 6: 1-6.

[21] Venkatesh R., Agarwal M., Singh S., Mayor R., Bansal A. (2017) Scleral buckle infection by *Serratia* species. Oman Journal of Ophthalmology 10: 36-37.

[22] Moles L., Gómez M., Moroder E., Jiménez E., Escuder D., Bustos G., Melgar A., Villa J., del Campo R., Chaves F., Rodríguez J.M. (2019) *Serratia marcescens* colonization in preterm neonates during their neonatal intensive care unit stay. Antimicrobial Resistance and Infection Control 8: 1-8.

[23] Yeo K.T., Octavia S., Lim K., Lin C., Lin R., Thoon K.C., Tee N.W.S., Young C.F. (2019) *Serratia marcescens* in the neonatal intensive care unit: A cluster investigation using molecular methods. Journal of Infection and Public Health 13: 1006-1011.

[24] Kim E.J., Park W.B., Yoon H.-K., Cho W.-S., Kim S.J., Oh Y.R., Jun K. II, Kang C.K., Choe P.G., Kim J.-II, Choi E.H., Oh M., D., Kim N.J. (2020) Outbreak investigation of *Serratia marcescens* neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razors. Antimicrobial Resistance and Infection Control 9: 1-7.

[25] Fernández A.L., Adrio B., Martínez Cereijo J.M., Martínez Monzonis M.A., El-Diasty M.M., Escudero J.A. (2020) Clinical study of an outbreak of postoperative mediastinitis caused by *Serratia marcescens* in adult cardiac surgery. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery 30: 523-527.

[26] Au C.W.H., Yap D.Y.H., Chan J.F.W., Yip T.P.S., Chan T.M. (2021) Exit site infection and peritonitis due to *Serratia* species in patients receiving peritoneal dialysis: Epidemiology and clinical outcomes. Nephrology (Carlton) 26: 255-261.

[27] Johnson A., Watson D., Dreyfus J., Heaton P., Lampland A., Spaulding A.B. (2020) Epidemiology of *Serratia* bloodstream infections among hospitalized children in The United States, 2009-2016. The Pediatric Infectious Disease Journal 39: 71-73.

[28] Lee S.-H., Park S.-J., Kwak D., Kim K.-T. (2017) Sudden death of an Indian peafowl (*Pavo cristatus*) at a zoo due to non-pigmented *Serratia marcescens* infection. The Journal of Veterinary Medical Science 79: 2048-2051.

[29] Poeta P., Sargo R.F., Valente J.M., Prada-Oliveira J., Silva F.C., Felício C.M.F., Costa L.M., Teixeira J., Pereira J.E., Varejão A. S.P. (2016) *Serratia marcescens* Discospondylitis in a White Stork (*Ciconia ciconia*). SOJ Microbiology & Infectious Diseases 4: 1-5.

[30] Friman M.J., Eklund M.H., Pitkälä A.H., Rajala-Schultz P.J., Rantala M.H.J. (2019) Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. Acta Veterinaria Scandinavica 61: 1-11.

[31] Siatka K. (2018) Rzadkie przyczyny mastitis. Hodowca Bydła 6: 46-51.

[32] Saidenberg A.B.S., Teixeira R.H.F., Astolfi-Ferreira C.S., Knöbl T., Piantino Ferreira A.J. (2007) *Serratia marcescens* Infection in a Swallow-tailed Hummingbird. Journal of Wildlife Diseases 43: 107-110.

[33] Grimont F., Grimont P.A.D. (2006) The Genus *Serratia*. Prokaryotes 6: 219-244.

[34] Das A.M., Paranjape V.L., Pitt T.L. (1988) *Serratia marcescens* infection associated with early abortion in cows and buffaloes. Epidemiology and Infection 101: 143-149.

[35] Kelly E.J., Baldwin T.J., Chamberlain A.P. (2015) Pathology in Practice. Dermatitis, cellulitis, and myositis caused by *S. marcescens* infection in a cat. Journal of the American Veterinary Medical Association 247: 897-899.

[36] Del-Pozo J., Girling S., Pizzi R., Mancinelli E., Else R.W. (2011) Severe necrotizing myo carditis caused by *Serratia marcescens* infection in an axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Journal of Comparative Pathology 144: 334-338.
[37] Kozińska A., Pękala A., Grawiński E. (2015) Nowo pojawiające się infekcje bakteryjne u ryb w Polsce. Medycyna Weterynaryjna 71: 548-552.
[38] Saidenberg A.B.S., Teixeira R.H.F., Astolfi-Ferreira C.S., Knöbl T., Ferreira A.J.P. (2007) *Serratia marcescens* Infection in a Swallow-tailed Hummingbird. Journal of Wildlife Diseases 43: 107-110.
[39] Aydin S., Erman Z., Bilgin Ö.C. (2001) Investigations of *Serratia liquefaciens* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 25: 643-650.
[40] Plavec T., Zdovc I., Juntes P., Svara T., Suhadolc Scholten S., Nemec A., Domanjko Petric A., Tozon N. (2008) Necrotizing fasciitis caused by *Serratia marcescens* after tooth extraction in a Doberman Pinscher: a case report. Veterinarni Medicina 53: 629-635.
[41] Guyonnet A., Ménard M., Mongellas E., Lassaigne C., Boulouis H.-J., Chahory S. (2019) Supposed endogenous endophthalmitis caused by *Serratia marcescens* in a cat. Open Veterinary Journal 9: 13-17.
[42] Abdullah A.H., Nadhom B.N., Al-Ammiri H.H. (2017) Isolation and Identification of *Serratia marcescens* from Bovine Mastitis infections in Iraq and their Susceptibility to Antibiotics. Journal of Entomology and Zoology Studies 5: 489-492.
[43] Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Smulski S., Markiewicz H., Kaczmarowski M. (2006) Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. Polish Journal of Veterinary Sciences 9: 191-194.
[44] Papatsiros V.G., Athanasiou L.V., Spanou V.M., Stylianaki I., Papakonstantinou G., Letsios M., Villioti C.S., Tsekouras N., Maragkakis G., Papaioannou N., Christodoulopoulos G. (2020) First case of *Serratia liquefaciens* isolated from urinary tract infection in sows and associated clinicopathological and pathological finding. Letters in Applied Microbiology 70: 259-262.
[45] Fox J.G., Beaucage C.M., Folta C.A., Thornton G.W. (1981) Nosocomial Transmission of *Serratia marcescens* in a Veterinary Hospital Due to Contamination by Benzalkonium Chloride. Journal of Clinical Microbiology 14: 157-160.
[46] Truszczyński M., Pejsak Z. (2016) Zoonozy wywoływane przez bakterie i wirusy, których gospodarzem jest świnia. Życie Weterynaryjne 91: 114-117.
[47] Gadhiya K.P., Goldman J., Panupong H., Balchander D., Cook E., Enriquez K., Smith D. (2001) Severe Skin Infections Due to *Serratia marcescens* A Case Associated With Cat Scratch in a Patient With Liver Disease and Review of the Literature. Infectious Diseases in Clinical Practice 29: 146-150.

[48] Pithadia D.J., Weathers E.N., Colombo R.E., Baer S. (2019) Severe and Progressive Cellulitis Caused by *Serratia marcescens* Following a Dog Scratch. Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports 7: 1-6.
[49] Chidambaram M., Charan M.S.P., Saraga K., Paramasivam J.D., Sujatha B. (2022) Necrotizing Fasciitis Due to *Serratia marcescens* Infection Following Snake Bite. Indian Journal of Pediatrics 89: 414.
[50] Grim K.D., Doberty C., Rosen T. (2010) *Serratia marcescens* bullous cellulitis after iguana bites. The Journal of the American Academy of Dermatology 62: 1075-1076.
[51] Hsieh S., Babl F.E. (1999) *Serratia marcescens* Cellulitis Following an Iguana Bite. Clinical Infectious Diseases 28: 1181-1182.
[52] Stock I., Grueger T., Wiedemann B. (2003) Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. International Journal of Antimicrobial Agents 22: 35-47.
[53] Mahlen S.D. (2011) *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. Clinical Microbiology Reviews 24: 755-791.
[54] Braun V., Ondraczek R., Hobbie S. (1993) Activation and Secretion of *Serratia* Hemolysin. Zentralblatt für Bakteriologie 278: 306-315.
[55] Campos-Cortés C.L., González G.M., Andrade A., de J. Treviño-Rangel R. (2018) Epidemiological Panorama of *Serratia marcescens*: Antimicrobial Resistance and Virulence Factors. Medicina Universitaria 20: 91-98.
[56] Rasheed M.N., Mohaisen S.H. (2017) Study of some environmental factors role in hemolysin gene expression in *Serratia marcescens* local isolates. Pakistan Journal of Biotechnology 14: 753-759.
[57] Hertle R. (2005) The Family of *Serratia* Type Pore Forming Toxins. Current Protein and Peptide Science 6: 313-325.
[58] Stella N.A., Brothers K.M., Shanks R.M.Q. (2021) Differential susceptibility of airway and ocular surface cell lines to FlhDC-mediated virulence factors PhlA and ShlA from *Serratia marcescens*. Journal of Medical Microbiology 70: 1-12.
[59] Shimuta K., Ohnishi M., Iyoda S., Gotoh N., Koizumi N., Watanabe H. (2009) The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. BMC Microbiology 9: 1-10.
[60] Krzyżewska E., Rybka J. (2018) Biosynteza lipopolisacharydów o zmiennej długości części O-swoistej jako czynnik wirulencji bakterii Gram-ujemnych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 72: 573-586.
[61] Kaszowska M. (2004) Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 58: 333-342.
[62] Pawłowska B.K., Sobieszczańska B.M. (2016) Model patogenezy enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* – kluczowa rola adhezji. Postępy Mikrobiologii 55: 119-131.

[63] Hertle R., Schwarz H. (2004) *Serratia marcescens* internalization and replication in human bladder epithelial cells. BMC Infectious Diseases 4: 1-14.
[64] Burchacka E., Witkowska D., Proteazy serynowe i ich funkcja w patogenezie zakażeń bakteryjnych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 70: 678-694.
[65] Benedik M.J., Strych U. (1998) *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. FEMS Microbiology Letters 165: 1-13.
[66] Jaeger K.-E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. (1994) Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews 15: 29-63.
[67] Antczak T., Graczyk J. (2002) Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne. Biotechnologia 2: 130-145.
[68] dela Cruz T.E.E., Torres J.M.O. (2012) Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology. https://asm.org/Protocols/Gelatin-Hydrolysis-Test-Protocol (dostęp 10.02.2022)
[69] Prażmo E., Godlewska R., Kwaśny M., Mielczarek A. (2016) Udział czynników wirulencji *Enterococcus faecalis* w rozwoju chorób miazgi i tkanek okołowierzchołkowych. Postępy Mikrobiologii 55: 247-254.
[70] Lipa P., Kozieł M., Janczerek M. (2017) Zjawisko Quorum Sensing bakterii Gram-ujemnych: cząsteczki sygnałowe i inhibitory oraz ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Postępy Biochemii: 63: 242-360.
[71] Myszka K., Czaczyk K. (2010) Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 64: 582-589.
[72] Houdt R.V., Givskov M., Michiels C.W. (2007) Quorum sensing in *Serratia*. FEMS Microbiology Reviews 31: 407-424.
[73] Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G. (2009) Efektywność bakterio-bójczego działania surowicy wynikająca z obecności układu dopełniacza i lizozymu wobec bakterii, które unikają odpowiedzi immunologicznej organizmu. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 63: 471-484.
[74] Hume E.B.H., Willcox M.D.P. (2001) Survival of *Serratia marcescens* in the Presence of Complement. Microbial Ecology in Health and Disease 13: 55-62.
[75] Jaworska K., Raczkowska A., Frindt J., Wachowicz J., Brzostek K. (2019) Mechanizmy funkcjonowania i regulacji systemów pobierania hemu u patogennych bakterii Gram-ujemnych. Postępy Mikrobiologii 58: 415-426.
[76] Weakland D.R., Smith S.N., Bell B., Tripathi A., Mobley H.L.T. (2020) The *Serratia marcescens* Siderophore Serratiochelin Is Necessary for Full Virulence during Bloodstream Infection. Infection and Immunity 88: 1-16.
[77] Jakubska-Busse A., Kędziora A., Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Bugla-Płoskońska G. (2021) Proteomics-based identification of orchid-associated bacteria colonizing the *Epipactis albensis*, *E. helleborine* and *E. purpurata* (*Orchidaceae, Neottieae*). Saudi Journal of Biological Sciences 28: 4029-4038.

[78] Lessa S.S., Paes R.C.S., Santoro P.N., Mauro R.A., Vieira-da-Motta O. (2011) Identification and antimicrobial resistance of microflora colonizing feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian pantanal. Brazilian Journal of Microbiology 42: 740-749.

[79] Zhang Y., Shang R., Zhang J., Li J., Zhu G., Yao M., Sun J., Shen Z. (2020) Isolation and identification of two *Serratia marcescens* strains from silkworm, *Bombyx mori*. Antonie van Leeuwenhoek 113: 1313-1321.

[80] Vengušt D. Ž., Kuhar U., Jerina K., Vengušt G. (2021) Twenty Years of Passive Disease Surveillance of Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in Slovenia. Animals 11: 1-12.

[81] Höll L., Behr J., Vogel R.F. (2016) Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. Food Microbiology 60: 84-91.

[82] Doulgeraki A.I., Paramithiotis S., Nychas G.-J.E. (2011) Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. International Journal of Food Microbiology 145: 77-83.

[83] Schwaiger K., Huther S., Hölzel C., Kämpf P., Bauer J. (2012) Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. International Journal of Food Microbiology 154: 206-211.

[84] Fontán M.C.G., Lorenzo J.M., Parada A., Franco I., Carballo J. (2007) Microbiological characteristics of ‘‘androlla’’, a Spanish traditional pork sausage. Food Microbiology 24: 52-58.

[85] Säde E., Murros A., Björkroth J. (2013) Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. Food Microbiology 34: 252-258.

[86] Wang G.-Y., Wang H.-H., Han Y.-W., Xing T., Ye K.-P., Xu X.-L., Zhou G.-H. (2017) Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. Food Microbiology 63: 139-146.

[87] Nakamura A., Takahashi H., Otomo K., Mizuno Y., Kuda T., Kimuraz B., Koike F., Kobayashi M. (2021) Dynamics of microbiota in Japanese Black beef stored for a long time under chilled conditions. Food Microbiology 100: 1-7.

[88] Machado S.G., Heyndrickx M., de Block J., Devreese B., Vandenberghe I., Vanetti M.C.D., van Coillie E. (2016) Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. International Journal of Food Microbiology 222: 65-71.

[89] Ikumapayi U.N., Kanteh A., Manneh J., Lamin M., Mackenzie G.A. (2016) An outbreak of *Serratia liquefaciens* at a rural health center in The Gambia. The Journal of Infection in Developing Countries 10: 791-798.

[90] Dubouix A., Roques C., Segonds C., Jeannot M.J., Malavaud S., Daude S., Chabanon G., Marty N. (2005) Epidemiological investigation of a *Serratia*

liquefaciens outbreak in a neurosurgery department. Journal of Hospital Infection 60: 8-13.
[91] O'Callaghan M., Jackson T.A. (1993) Isolation and enumeration of *Serratia entomophila* - a bacterial pathogen of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica.* Journal of Applied Bacteriology 75: 307-314.
[92] MBT Compass IVD. Podręcznik użytkownika. Wersja B (Październik 2016). Bruker Daltonik GmbH, 1-105.
[93] Rychert J. (2019) Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. Journal of Infectiology 2: 1-5.
[94] BLAST, Basic Local Alignment Search Tool. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (dostęp 08.04.2022)
[95] Church D.L., Cerutti L., Gürtler A., Griener T., Zelazny A., Emler S. (2020) Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Reviews 33: 1-74.
[96] Indykatory stosowane w podłożu DNASe agar. https://microbiologynote.com/dnase-test/ (dostęp 10.09.2022)
[97] Podłoże DNASe agar z błękitem toluidynowym. https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-remel-dnase-test-agar-w-toluidine-blue-monoplate-10-pk/r01377 (dostęp 10.09.2022).
[98] Podłoże z dodatkiem żelatyny. https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/pheno_tests/Gelatin_Hydrolysis/ (dostęp 10.09.2022)
[99] Podłoże Columbia. https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sial/27688 (dostęp 07.08.2022)
[100] Izolacja DNA genomowego. https://www.aabiot.com/genomic-mini?search=genomic%20mini (dostęp 12.05.2022)
[101] Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki reakcji PCR. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012393_Phusion_HighFidelity_DNAPolymerase_UG.pdf (dostęp 14.05.2022)
[102] Hitchcock P.J., Brown T.M. (1983) Morphological Heterogeneity Among Salmonella Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. Journal od Bacteriology 154: 269-277.
[103] Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
[104] Tsai C.-M., Frasch C.E. (1982) A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 119: 115-119.

[105] Fomsgaard A., Freudenberg M.A., Galanos C. (1990) Modification of the Silver Staining Technique To Detect Lipopolysaccharide in Polyacrylamide Gels. Journal of Clinical Microbiology 28: 2627-2631.

[106] Miles A.A., Mirsa S.S., Irwin J.O. (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood. The Journal of hygiene 38: 732-749.

[107] Pawlak A., Rybka J., Dudek B., Krzyżewska E., Rybka W., Kędziora A., Klausa E., Bugla-Płoskońska G. (2017) *Salmonella* O48 Serum Resistance is Connected with the Elongation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Containing Sialic Acid. International Journal of Molecular Sciences 18: 1-12.

[108] Cieniuch Gabriela. (2018) Analiza zależności pomiędzy bioróżnorodnością mikroflory zwierząt a bakteriami izolowanymi ze środowiska ich bytowania (Praca magisterska). Obrona 09.07.2018 roku.

[109] Morka K., Bugla-Płoskonska G. (2017) Rola czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica* w nadawaniu oporności na działanie układu dopełniacza. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia 69: 269-279.

[110] Miętka K., Brzostek K., Guz-Regner K., Bugla-Płoskońska G. (2016) The mechanisms of complement activation in normal bovine serum and normal horse serum against *Yersinia enterocolitica* O:9 strains with different outer membrane proteins content. Polish Journal of Veterinary Sciences 19: 99-107.

[111] Dudek B., Krzyżewska E., Kapczyńska K., Rybka J., Pawlak A., Korzekwa K., Klausa E., Bugla-Płoskońska G. (2016) Proteomic Analysis of Outer Membrane Proteins from *Salmonella* Enteritidis Strains with Different Sensitivity to Human Serum. PLOS ONE 3: 1-16.

[112] Sarowska J., Futoma-Kołoch B., Jarna-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Książczyk M., Bugla-Płoskońska G., Choroszy-Krol I. (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut Pathogens 11: 1-16.

[113] Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., Rybka J., Łukowiak A., Bugla-Płoskońska G. (2018) Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. International Journal of Molecular Sciences 19: 1-14.

[114] Kędziora A., Wernecki M., Korzekwa K., Speruda M., Gerasymchuk Y., Łukowiak A., Bugla-Płoskońska G. (2020) Consequences Of Long-Term Bacteria's Exposure To Silver Nanoformulations With Different Physico-Chemical Properties. International Journal of Nanomedicine 15: 199-213.

[115] Rasheed M.N., Mohaisen S.H. (2017) Study of some environmental factors role in hemolysin gene expression in *Serratia marcescens* local isolates. The Pakistan Journal of Biotechnology 14: 753-759.

[116] Ćwiek K., Bugla-Płoskońska G., Wieliczko A. (2019) *Salmonella* biofilm development: Structure and significance. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 73: 937-943.

[117] Książczyk M., Dudek B., Kuczkowski M., O'Hara R., Korzekwa K., Wzorek A., Korzeniowska-Kowal A., Upton M., Junka A., Wieliczko A., Ratajszczak R., Bugla-Płoskońska G. (2021) The Phylogenetic Structure of Reptile, Avian and Uropathogenic *Escherichia coli* with Particular Reference to Extraintestinal Pathotypes. International Journal of Molecular Sciences 22: 1-21.

[118] Ćwiek K., Korzekwa K., Tabiś A., Bania J., Bugla-Płoskońska G., Wieliczko A. (2020) Antimicrobial Resistance and Biofifilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. Pathogens 9: 1-22.

[119] Dudek B., Książczyk M., Krzyżewska E., Rogala K., Kuczkowski M., Woźniak-Biel A., Korzekwa K., Korzeniowska-Kowal A., Ratajszczak R., Wieliczko A., Rybka J., Bugla-Płoskońska G. (2019) Comparison of the phylogenetic analysis of PFGE profiles and the characteristic of virulence genes in clinical and reptile associated *Salmonella* strains. BMC Veterinary Research 15: 1-12.

[120] Morka K., Wałecka-Zacharska E., Schubert J., Dudek B., Woźniak-Biel A., Kuczkowski M., Wieliczko A., Bystroń J., Bania J., Bugla-Płoskońska G. (2021) Genetic Diversity and Distribution of Virulence-Associated Genes in *Y. enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-Like Isolates from Humans and Animals in Poland. Pathogens 10: 1-16.

[121] Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Wzorek A., Morka K., Bania J., Bystroń J., Bugla-Płoskońska G., (2019) "Game animals as a source of *Serratia* sp. - an opportunistic pathogen for humans". 3rd Wroclaw Scientific Meetings, Wroclaw.

[122] Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Wzorek A., Bystroń J., Bugla-Płoskońska G. (2021) „Charakterystyka patogenności odzwierzęcych pałeczek z rodzaju Serratia". VI Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią (online), 24-25.06.2021

[123] Cieniuch G., Wzorek A., Bystroń J., Korzeniowska-Kowal A., Bugla-Płoskońska G. (2021) „Comparative analysis of Gram-negative bacteria isolated from farm animals on the example of pigs (*Sus scrofa domestica*) and cows (*Bos taurus taurus*) in Poland". ECCO (online), 22-24.09.2021

[124] Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Wzorek A., Bystroń J., Bugla-Płoskońska G. (2022) „Virulence potential of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* strains isolated from selected animals" ECCO, 27-29.08.2022

[125] Gliński Z., Kostro K. (2017) Profilaktyka zoonoz od grubej zwierzyny łownej. Życie Weterynaryjne 92: 493-495.

[126] Gliński Z. (2016) Zoonotyczne choroby zwierząt łownych. Część I. Włośnica, wścieklizna,tularemia, borelioza. Życie Weterynaryjne 91: 560-564.

[127] Truszczyński M., Pejsak Z. (2016) Zoonozy wywoływane przez bakterie i wirusy, których gospodarzem jest świnia. Życie Weterynaryjne 91: 114-117.

[128] McDaniel C.J., Cardwell D.M., Moeller R.B., Gray G.C. (2014) Humans and Cattle: A Review of Bovine Zoonoses. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 14: 1-19.
[129] Lowe B.A., Marsh T.L., Isaacs-Cosgrove N., Kirkwood R.N., Kiupel M., Mulks M.H. (2012) Defining the „core microbiome" of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. BMC Microboiology 12: 1-14.
[130] Mann E., Pinior B., Wetzels S.U., Metzler-Zebeli B.U., Wagner M., Schmitz-Esser S. (2015) The Metabolically Active Bacterial Microbiome of Tonsils and Mandibular Lymph Nodes of Slaughter Pigs. Frontiers in Microbiology 6: 1-10.
[131] Kernaghan S., Bujold A.R., Maclnnes J.I. (2012) The microbiome of the soft palate swime. Animal Health Research Review 13: 110-120.
[132] Baele M., Chiers K., Devriese L.A., Smith H.E., Wisselink H.J., Vaneechoutte M., Haesebrouck F. (2001) The Gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after wearing. Journal of Applied Microbiology 91: 997-1003.
[133] Isaacson R., Kim H.B. (2012) The intestinal microbiome of the pig. Animal Health Research Reviews 13: 100-109.
[134] Xu Q., Qiao Q., Hou J., Hu M., Du Y., Zhao K., Li X. (2021) Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow. Frontiers in Nutrition 8: 1-13.
[135] Lim A.-K., Kim D., Moon D.-C., Cho Y., Rho M. (2020) Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. GigaScience 9: 1-11.
[136] Timsit E., McMullen C., Amat S., Alexander T.W. (2020) Respiratory Bacterial Microbiota in Cattle. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 36: 297-320.
[137] Schubert S., Kostrzewa M. (2017) MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. Current Issues in Molecular Biology 23: 17-20.
[138] Tsuchida S., Umemura H., Nakayama T. (2020) Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. Molecules 25: 1-13.
[139] Karkouri K.E., Couderc C., Decloquement P., Abeille A., Raoult D. (2019) Rapid MALDI-TOF MS identification of commercial truffles. Scientific Reports 9: 1-9.
[140] Murugaiyan J., Roesler U. (2017) MALDI-TOF MS Profiling-Advances in Species Identification of Pests, Parasites, and Vectors. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7: 1-9.
[141] Fidelis C.E., Franke M., de Abreu L.C.R., Jagielski T., Ribeiro M.G., dos Santos M.V., Gonçalves J.L. (2021) MALDI-TOF MS identification of Prototheca algae associated with bovine mastitis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 33: 1168-1171.

[142] Ilnes R.K., Iles J.K., Zmuidinaite R., Roberts M. (2022) A How to Guide: Clinical Population Test Development and Authorization of MALDI-ToF Mass Spectrometry-Based Screening Tests for Viral Infections. Viruses 14: 1-23.
[143] Feucherolles M., Poppert S., Utzinger J., Becker S.L. (2019) MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. Parasites Vectors 12: 1-13.
[144] Fall F.K., Laroche M., Bossin H., Musso D., Parola P. (2021) Performance of MALDI-TOF Mass Spectrometry to Determine the Sex of Mosquitoes and Identify Specific Colonies from French Polynesia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 104: 1907-1916.
[145] Ashfaq M., Da'na D.A., Al-Ghouti M.A. (2022) Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. Journal of Environmental Management 305: 1-25.
[146] Szczepańska E., Robak M. (2013) Proteomika w badaniu drobnoustrojów. Biotechnologia 12: 25-40.
[147] Kosikowska U., Stępień-Pyśniak D., Pietras-Ożga, Andrzejczuk S., Juda M., Malm A. (2015) Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. Diagnostyka Laboratoryjna 51: 23-30.
[148] Wanecka A., Król J., Twardoń J., Mrowiec J., Korzeniowska-Kowal A., Wzorek A. (2019) Efficacy of MALDI-TOF mass spectrometry as well as genotypic and phenotypic methods in identification of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* isolated from intramammary infections in dairy cows in Poland. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 31: 523-530.
[149] Bierowiec K., Korzeniowska-Kowal A., Wzorek A., Rypuła K., Gamian A. (2019) Prevalence of *Staphylococcus* Species Colonization in Healthy and Sick Cats. BioMed Research International 2019: 1-10.
[150] Morka K., Bystroń J., Bania J., Korzeniowska-Kowal A., Korzekwa K., Guz-Regner K., Bugla-Płoskońska G. (2018) Identification of *Yersinia enterocolitica* isolates from humans, pigs and wild boars by MALDI TOF MS. BMC Microbiology 18: 1-10.
[151] RÍsbäck T., Rosendal T., Stampe M., Sannö A., Aspán A., Järnevi K., Lahti E.T. (2018) Prevalence of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Swedish pig farms. Acta Veterinaria Scandinavica 60: 1-8.
[152] Stamm I., Hailer M., Depner B., Kopp P.A., Rau J. (2013) *Yersinia enterocolitica* in Diagnostic Fecal Samples from European Dogs and Cats: Identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 51: 887-893.
[153] Rouffaer L.O., Strubbe D., Teyssier A., Hudin N.S., Van den Abeele A.-M., Cox I., Haesendonck R., Delmée M., Haesebrouck F., Pasmans F., Lens L., Martel A. (2017) Effects of urbanization on host-pathogen interactions, using *Yersinia* in house sparrows as a model. PLOS ONE 27: 1-15.

[154] Florek M., Nawrot U., Korzeniowska-Kowal A., Włodarczyk K., Wzorek A., Woźniak-Biel A., Brzozowska M., Galli J., Bogucka A., Król J. (2021) An analysis of the population of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from animals in Poland, in the years 2015–2019. Scientific Reports 11: 1-13.
[155] Gnat S., Lagowski D., Nowakiewicz A. (2020) Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów. Postępy Mikrobiologii 53: 315-324.
[156] Gaston M.A., Duff P.S., Pitt T.L. (1988) Lipopolysaccharide Heterogeneity in Strains of *Serratia marcescens* Agglutinated by O14 Antiserum. Current Microbiology 17: 27-31.
[157] Hamadeh R.M., Mandrell, McLeod Griffiss J. (1990) Immunophysical Characterization of Human Isolates of *Serratia marcescens*. Journal of Clinical Microbiology 28: 20-26.
[158] Grossmann N., Schmetz M.A., Foulds J., Klima E.N., Jiminez V., Leive L.L., Joiner K.A. (1978) Lipopolysaccharide Size and Distribution Determine Serum Resistance in *Salmonella montevideo*. Journal of Bacteriology 169: 856-863.
[159] Salamon H., Nissim-Eliraz E., Ardronai O., Nissan I., Shpigel N.Y. (2020) The role of O-polysaccharide chain and complement resistance of *Escherichia coli* in mammary virulence. Veterinary Research 51: 1-14.
[160] Kaca W., Arabski M., Fudała R., Holmström E., Sjöholm A., Weintraub A., Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G., Doroszkiewicz W. (2009) Human complement activation by smooth and rough *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 57: 383-391.
[161] Estabrook M.M., Griffiss J.M., Jarvis G.A. (1997) Sialylation of *Neisseria meningitidis* Lipooligosaccharide Inhibits Serum Bactericidal Activity by Masking Lacto-N-Neotetraose. Infection and Immunity 65: 4436-4444.
[162] Merino S., Camprubí S., Albertí S., Bededí V.-J., Tomás J.M. (1992) Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Complement-Mediated Killing. Infection and Immunity 60: 2529-2535.
[163] Wolska K., Bukowski K., Anusz Z., Jakubczak A. (1999) Bakteriobójcza aktywność surowicy ludzkiej, świńskiej i bydlęcej wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia 51: 339-345.
[164] Kshetri L., Naseem F., Pandey P. Role of *Serratia* sp. as Biocontrol Agent and Plant Growth Stimulator, with Prospects of Biotic Stress Management in Plant. W: Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management. Pod red. Sayyed R. Z. Microorganisms for Sustainability 13, 2019, 169-199.
[165] Mnif S., Jardak M., Bouizgarne B., Aifa S. (2022) Prodigiosin from *Serratia*: Synthesis and potential applications. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 12: 233-242.

[166] Salama A.S., Toliba A.O., Akl B.A. (2019) Sensory evolution, antioxidant, antimicrobial activities and color of strawberry nectar enriched with prodigiosin pigment produced from *Serratia marcescens*. Pakistan Journal of Biotechnology 16: 211-218.
[167] Mehta M., Shah G. (2015) Extraction of pigment from *Serratia marcescens* ant its application in candle industry. Advances in Applied Science Research 7: 1-4.
[168] Black W.A., Hodgson R., McKechnie A. (197) Evaluation of three methods using deoxyribonuclease production as a screening test for *Serratia marcescens*. Journal of Clinical Pathology 24: 313-316.