

7. Streszczenie

Bakterie *Escherichia coli* zaliczane do rodziny *Enterobacteriaceae* stanowią stałą i dominującą mikroflorę przewodu pokarmowego ssaków i ptaków zasiedlając jelito grube bezpośrednio po urodzeniu i przebywając w nim przez cały okres życia organizmu. Bytując wewnątrzustrojowo pełnią bardzo wiele pożytecznych funkcji, np. biorą udział w produkcji witamin z grupy B, C, K i kwasu foliowego, uczestniczą w rozkładzie pokarmu, a także hamują wzrost bakterii chorobotwórczych dla organizmu gospodarza. Jednak szereg czynników zewnętrznych, takich jak: stres, nieodpowiednia zmiana pożywienia, brak dezynfekcji i higieny oraz antybiotykoterapia mogą wpływać na zaburzenia równowagi fizjologicznej mikroflory jelitowej, przyczyniając się do namnożenia patogennych szczepów *E. coli*, a w konsekwencji rozwoju stanu chorobowego zwanego Kolibakteriozą.

Znaczna część prac w literaturze krajowej i zagranicznej poświęcona jest patogennym szczepom *E. coli* izolowanym od ludzi, bydła i prosiąt, natomiast niewiele publikacji dotyczy szczepów APEC (ang. *Avian Pathogenic Escherichia coli*), odpowiedzialnych za rozwój infekcji u drobiu określanych jako kolibakterioza. APEC są odpowiedzialne za występowanie stanów zapalnych worka osierdziowego i worków powietrznych, uporczywe biegunki, zapalenie woreczka żółtkowego, posocznicę i wiele innych jednostek chorobowych, które stanowią przyczynę znacznych strat ekonomicznych w hodowli drobiu, szczególnie indyków, kurcząt, kaczek i gęsi.

Liczne badania dotyczące patogennych *E. coli* pochodzących od drobiu wykazały, że należą one do grup serologicznych: O1, O2, O8, O15, O18, O78, O115, z których najczęściej izolowano grupy O1, O2, O78, będące przyczyną kolibakteriozy wywołanej przez APEC. Chorobotwórczość szczepów *E. coli* u drobiu jest zależna od ich inwazyjności i zdolności wytwarzania toksyn. Szczepy toksynotwórcze powodują zatrucie organizmu poprzez produkcję dużej ilości toksyn w jelitach, np.: toksyny LT-I, ST-I, ST-II, fimbrii 41, fimbrii F4, intyminy, fimbrii F6, fimbrii F18, fimbrii F5, a także toksyn Shiga, występujących w dwóch odmianach: Stx1 i Stx2, powodujących krwotoczne zapalenie jelit u drobiu. Ze względu na mechanizmy działania chorobotwórczego i wytwarzane markery zjadliwości w obrębie patogennych pałeczek *E. coli* wyodrębniono szczepy: enterotoksyczne (ETEC), enteroinwazyjne (EIEC), enteropatogenne (EPEC), enteroagregacyjne (EAEC/EAggEC), o rozsianym typie adhezji (DAEC), adherentno-inwazyjne (AIEC) oraz shigatoksyczne/enterokrwotoczne (STEC/EHEC)

W leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy APEC tradycyjnie stosowana jest terapia antybiotykowa, jednak z powodu powszechnie wzrastającego zjawiska lekooporności

wśród drobnoustrojów, skuteczność takich terapii jest znikoma. Co więcej w okresie ostatniego 20-lecia coraz częściej wśród drobnoustrojów obserwowane są przypadki wielooporności (ang. Multiple Drug Resistance – MDR), w których dany szczep bakterii oporny jest jednocześnie na kilka grup antybiotyków. Jednym z najistotniejszych epidemiologicznie i klinicznie mechanizmów oporności na leki u szczepów *E. coli* jest wytwarzanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL), rozkładających penicyliny, cefalosporyny I-III generacji, monobaktamy i wykazujących słabą aktywność wobec cefamycyn.

Mając na uwadze istotne zagrożenie wynikające z występowania wielooporności wśród bakterii wywołujących kolibakteriozy u drobiu, celem niniejszej pracy doktorskiej była izolacja oraz kompleksowa fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych od różnych gatunków drobiu ze szczególnym uwzględnieniem klasyfikacji serologicznej badanych szczepów, oraz ich oporności na wybrane antybiotyki.

W pierwszym etapie badań wyizolowano na podłożach mikrobiologicznych 73 szczepy *E. coli* pochodzące od różnych gatunków padłych ptaków. Następnie dokonano oceny makroskopowej izolatów, przeprowadzono testy na obecność enzymu katalazy oraz zbadano morfologię pojedynczych komórek w preparatach barwionych według metody Grama. Przynależność gatunkową badanych izolatów dodatkowo potwierdzono metodą spektrometrii mas - MALDI-TOF MS, a klasyfikację serologiczną szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem monospecyficznego surowca testowego O1, O2, O78 dla antygeny somatycznego O. Następnie w stosunku do uzyskanych izolatów bakteryjnych oceniono wrażliwość *E. coli* na wybrane antybiotyki metodą minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (ang. *Minimal Inhibitory Concentration* - MIC) z wykorzystaniem komercyjnych płytek antybiogramowych, zawierających 25 antybiotyków w różnych stężeniach. Wykonano również analizę genetyczną patogennych szczepów *E. coli* w zakresie występowania genów kodujących czynniki wirulencji (toksyny: Stx1 i Stx2, fimbria 41, F4, F5, F6, F18, intymina, LT-I, ST-I, ST-II) oraz genów oporności na wybrane antybiotyki (w tym: beta-laktamy, aminoglikozydy, tetracykliny, fenikole, trimetoprim i sulfonamidy) przy użyciu techniki PCR oraz multiplex PCR.

Pod względem morfologicznym na podłożu Columbia Agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej wyhodowano duże, błyszczące, szare kolonie, barwiące się Gram-ujemnie na kolor różowy oraz wytwarzające enzym katalazę, a przynależność gatunkowa wszystkich 73 szczepów *E. coli* została dodatkowo potwierdzona metodą spektrometrii mas - MALDI-TOF MS.

Przeprowadzona analiza serologiczna wykazała, że najwyższy odsetek szczepów należał do serotypu O78, następnie do serotypu O2, natomiast najrzadziej występował serotyp O1. Analizowane szczepy *E. coli* charakteryzowały się zróżnicowaną lekowrażliwością. W stosunku do pałeczek okrężnicy wyizolowanych od drobiu najskuteczniej działały: cefquinom, ceftiofur, gentamycyna, kolistyna, cefaleksyna i neomycyna. Ponadto, wszystkie badane izolaty pałeczek okrężnicy były odporne na: nafcylinę, penicylinę G, erytromycynę, tylozynę, tylwalozynę, linkomycynę, tiamulinę. W populacji badanych szczepów *E. coli* stwierdzono występowanie wielolekoopornych izolatów, które wykazywały oporność na co najmniej 8 z 25 badanych leków antybakteryjnych. Wykazano, że najczęściej występującym genem oporności był *dhfrV*. Ponadto u trzech szczepów *E. coli* wykryto występowanie genów kodujących toksynę Stx1, zaś u dwóch Fimbrię F18.

Zakażenia drobiu patogennymi szczepami *E. coli* stanowią zagrożenie także dla człowieka. Obecność w pokarmie już nawet 10-50 bakterii może doprowadzić do występowania infekcji u ludzi stanowiących zagrożenie dla życia i zdrowia. Patogenne szczepy *E. coli* pochodzące z mięsa drobiowego, za pośrednictwem toksyn, kolonizują jelito grube, uszkadzają kosmki jelitowe, komórki nerek i mogą być również przyczyną zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS).

Reasumując, na podstawie uzyskanów rezultatów należy podkreślić konieczność prowadzenia badań z zakresu szczegółowej identyfikacji i charakterystyki drobnoustrojów z rodzaju *E. coli* ze szczególnym uwzględnieniem ich wirulencji oraz lekooporności, co niewątpliwie przyczyni się do poszerzenia wiedzy z możliwości ograniczania występowania zagrożeń dla zwierząt oraz konsumentów drobiu.