

Streszczenie

Escherichia coli (*E. coli*) jest naturalnym komponentem mikrobioty ludzi i zwierząt oraz występuje powszechnie w środowisku bytowania człowieka i zwierząt. Niektóre szczepy wykształciły również wiele cech i przystosowań do wywoływania infekcji jelitowych lub pozajelitowych u gospodarza. W literaturze krajowej i zagranicznej występuje wiele prac dotyczących oporności bakterii *E. coli* na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe. Najlepiej poznaną pod względem oporności jest grupa zwierząt gospodarskich objętych obligatoryjnymi monitoringami oporności. Opublikowano również kilka prac badawczych w Polsce, dotyczących oporności *E. coli* izolowanej od zwierząt towarzyszących, które poprzez bliski kontakt mogą w łatwy sposób przenosić bakterie lekooporne również na człowieka.

Kolejną szczególnie interesującą grupą badawczą wydają się być zwierzęta wolno żyjące. Zwierzęta wolno żyjące jako nie poddawane terapii celowanej z założenia powinny być nosicielami niższego odsetka szczepów opornych na leki i wskazywać realne odwzorowanie poziomu lekooporności występującego w środowisku. Z drugiej strony, we współczesnym środowisku występuje wiele gatunków zwierząt o wysokim potencjale synantropizacji. Gatunki takie jak lis rudy, kuna domowa czy norka coraz częściej podchodzą do gospodarstw i siedzib człowieka celem znalezienia łatwo dostępnych źródeł pożywienia. W ten sposób zwierzęta te mogą przyczynić się do przenoszenia mikroorganizmów opornych na leki wśród pozostałych grup zwierząt, człowieka i środowiska. W Polsce dane dotyczące występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u *E. coli* izolowanej od zwierząt wolno żyjących są jak do tej pory ograniczone. Wynika to prawdopodobnie przede wszystkim z trudności w dostępności do materiału badawczego.

Niniejsza praca dotyczy wielopoziomowej analizy zjawiska lekooporności szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących. Realizując badania, poszczególne gatunki zwierząt analizowano w aspekcie przeważającego typu diety, która w zależności od poziomu zróżnicowania może wpływać na poziom lekooporności badanych szczepów; oddzielnie przebadano poziom lekooporności szczepów pochodzących od zwierząt mięsożernych oraz zwierząt wszystkożernych i roślinożernych. Oddzielną grupą badawczą były izolaty o fenotypie oporności na cefalosporyny trzeciej generacji (ang. cephalosporin resistant CR). W pracy zastosowano unikatowe podejście do etapu izolacji szczepów wykorzystujące kombinacje czterech podłoży i zwiększające prawdopodobieństwo otrzymania

kilku szczepów opornych na co najmniej jeden lek z pojedynczej próby. Różnicowanie szczepów przeprowadzono na poziomie fenotypowym badając oporność szczepów oraz genotypowym analizując profile genomowe uzyskanych izolatów. Za pomocą metod biologii molekularnej przeprowadzono analizę występowania genetycznych determinant oporności i szerokiego panelu genów związanych z wirulencją. W wybranych izolatach (szczepy odporne na cefalosporyny CR) określono także typy sekwencyjne szczepów *E. coli*.

Zastosowanie kilku podłoży do izolacji szczepów pozwoliło uzyskać izolaty z 71,6% próbek pochodzących od zwierząt mięsożernych i z 50,9% próbek od zwierząt wszystkożernych i roślinożernych opornych na co najmniej jedną substancję przeciwbakteryjną. Wyizolowane szczepy wykazywały znaczną różnorodność zarówno pod względem fenotypu oporności jak i profili genomowych. Wstępne zastosowanie metody dyfuzyjno-krażkowej celem wykluczenia tych samych izolatów z danej próbki (ryzyko przeszacowania wyników) pozwoliło na eliminację zaledwie 13 szczepów. Natomiast profile genomowe izolatów otrzymane przy użyciu metody ADSRRS-fingerprinting, różniły się zarówno pod względem liczby uzyskanych prążków (od 5 do 19), jak i wielkością uzyskanych fragmentów.

Badane szczepy *E. coli* cechowały się wiodącą opornością na ampicylinę (98,3%), tetracyklinę (69,7%) oraz sulfametoksazol (52,6%). We wszystkich grupach badawczych uzyskano podobny udział szczepów wielolekoopornych (oporność na co najmniej trzy substancje przeciwbakteryjne, należące do różnych grup) wynoszący około 70%. Oporność na ciprofloksacynę wykazano u 24% izolatów, jednakże największy ich udział został odnotowany u szczepów opornych na cefalosporyny. Oporność fenotypowa została potwierdzona występowaniem genetycznych determinant oporności głównie następujących genów: *tetA* (u szczepów opornych na tetracyklinę) i *sul2* (u szczepów opornych na sulfametoksazol). Najczęściej występującymi genami warunkującymi oporność na fluorochinolony, przenoszoną na drodze horyzontalnej wymiany (ang. PMQR, plasmid mediated quinolone resistance), były *qnrS*, *qnrB* i *aac(6')-Ib*. Szczepy odporne na cefalosporyny charakteryzowały się wytwarzaniem zróżnicowanego panelu nabytych β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ang. extended spectrum beta lactamase, ESBL) i cefalosporynaz (AmpC). Fenotyp ten wynikał najczęściej z ekspresji genów *bla_{CMY-2}* oraz genów z grupy *bla_{CTX-M-1}* i z grupy *bla_{CTX-M-9}*.

Analiza genów wirulencji wykazała występowanie najczęściej szczepów wywołujących infekcje pozajelitowe (ExPEC) oraz pojedyncze szczepy o patotypie ETEC (ang. enterotoxigenic *E. coli*) i EHEC (ang. enterohemorrhagic *E. coli*). Najczęściej

występującymi typami sekwencyjnymi wśród badanych szczepów *E. coli* były te, które należały do kompleksów klonalnych: 10, 155, 23 i 69.

Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność badania zwierząt wolno żyjących jako potencjalnego rezerwuaru szczepów *E. coli* opornych na powszechnie stosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe. Badania wykazały pozytywną zależność pomiędzy opornością na cefalosporyny i występowaniem genów PMQR. Nie wykazano również zależności pomiędzy występowaniem fenotypu wielolekoopornego i wirulentnego wśród badanych izolatów *E. coli*.

Osinska Marcelina
28.03.2022