

Przemysław Knysz

**Bakterie rodzaju *Enterococcus* izolowane z tusz zwierząt rzeźnych
i dziczyzny jako potencjalne zagrożenie zdrowia konsumenta**

Rozprawa doktorska

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to powszechnie występujące drobnoustroje, zaliczane do bakterii kwasu mlekowego (LAB), które współtworzą mikrobiotę jelitową ludzi i zwierząt. Wykazują one oportunistyczny charakter, czyli w określonych warunkach, zazwyczaj związanych ze zmianą miejsca bytowania w organizmie, mogą stać się przyczyną poważnych infekcji i zatruc pokarmowych. Największym znaczeniem dla zdrowia publicznego odznaczają się gatunki *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, szczególnie ich szczepy o cechach wielolekooporności. Na przestrzeni ostatnich lat bakterie należące do tych dwóch gatunków zyskały na znaczeniu jako czynniki zakażeń ludzi, które stwarzają duże trudności w terapii.

Zwierzęta hodowlane są często rezerwuarem opornych na antybiotyki szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, które mogą zostać przeniesione na człowieka poprzez żywność pochodzenia zwierzęcego. Wieloetapowa procedura uboju zwierząt rzeźnych niesie za sobą ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego ich tusz i narządów wewnętrznych, a jego źródłem może być przewód pokarmowy poddanego ubojowi zwierzęcia, jak również personel przeprowadzający procedury ubojowe.

W dostępnej literaturze brak jest informacji dotyczących częstości występowania oraz lekooporności *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z powierzchni tusz różnych gatunków zwierząt rzeźnych oraz dzików. Stąd celem pracy było określenie częstości występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz bydła i świń, tuszek drobiu i królików, a także tusz dzików, pochodzących z rzeźni oraz zakładów przetwórstwa dziczyzny zlokalizowanych na obszarze Polski, uwzględniając częstość występowania dwóch gatunków powodujących groźne zakażenia ludzi (*Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*). Ponadto, celem pracy było także oznaczenie ich oporności fenotypowej i genotypowej na antybiotyki oraz prześledzenie pokrewieństwa genetycznego szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* wyizolowanych z tusz poszczególnych gatunków zwierząt rzeźnych oraz dzików.

W pierwszej części badań pobrano wymazy z powierzchni 196 tusz bydła, 160 tusz świń, 198 tuszek drobiu, 496 tuszek królików i 216 tusz dzików. Przeprowadzono nieselektywne namnożenie bakterii w buforowanej wodzie peptonowej, a następnie wykonano posiew z wykorzystaniem wybiórczo różnicującego podłoża Slanetz and Bartley LAB-AGAR. Typowe kolonie bakteryjne poddano dalszym testom potwierdzającym przynależność do rodzaju *Enterococcus*, czyli barwienie metodą Grama, próbę na zdolność wytwarzania katalazy, próbę na zdolność hydrolizy eskuliny i próbę na zdolność wzrostu w podłożu z 6,5% NaCl. Potwierdzono obecność bakterii *Enterococcus* spp. na powierzchni 1112 badanych zwierząt, co stanowiło 88% wszystkich badanych tusz. W następnym etapie przeprowadzono badanie techniką PCR w celu identyfikacji gatunków *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. W populacji *Enterococcus* spp. z powierzchni tusz bydła zidentyfikowano 27 szczepów z gatunku *E. faecalis* (13,7% badanych tusz) i 14 szczepów *E. faecium* (7,1% badanych tusz), z powierzchni tusz świń 41 szczepów *E. faecalis* (25,6% badanych tusz) i 12 szczepów *E. faecium* (7,5% badanych tusz), z powierzchni tuszek drobiu 159 szczepów *E. faecalis* (79,9% badanych tuszek) i 11 szczepów *E. faecium* (5,5% badanych tuszek), z powierzchni tuszek królików 237 szczepów *E. faecalis* (47,8% badanych tuszek) i z powierzchni tusz dzików 63 szczepy *E. faecalis* (29,7% badanych tusz) i 39 szczepów *E. faecium* (18,4% badanych tusz).

Wszystkie bakterie z gatunku *E. faecalis* (n=527) i *E. faecium* (n=76) poddano następnie badaniu fenotypowej oporności na antybiotyki (penicylinę, ampicylinę, erytromycynę, wankomycynę, gentamycynę, kanamycynę, streptomycynę, tetracyklinę, ciprofloksacynę, enrofloksacynę) metodą minimalnych stężeń hamujących (MIC). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wysoki odsetek szczepów *Enterococcus faecalis* wykazujących oporność na tetracyklinę (80,3%) i erytromycynę (66,7%), niezależnie od gatunku zwierzęcia, z którego zostały wyizolowane, natomiast wśród szczepów z gatunku *Enterococcus faecium* najczęściej stwierdzono oporność na enrofloksacynę (78,9%) i ciprofloksacynę (56,6%). Następnie wszystkie szczepy *E. faecalis* i *E. faecium* poddano badaniu techniką multiplex PCR w celu molekularnej oceny oporności na antybiotyki aminoglikozydowe, makrolidy, tetracyklinę i glikopeptydy. Najczęściej stwierdzanym genem warunkującym oporność na antybiotyki był gen odpowiedzialny za oporność na tetracyklinę *tetM*, który posiadało 430 szczepów *E. faecalis* (81,6%) i 34 szczepy *E. faecium* (44,7%). Ponadto, wśród badanych szczepów wykazano obecność genu *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, warunkującego oporność na gentamycynę i inne antybiotyki aminoglikozydowe poza streptomycyną, genu *ant(6)-Ia* warunkującego oporność na streptomycynę, genu *aph(3')-IIIa* warunkującego oporność na kanamycynę, genu *ermB* warunkującego oporność na erytromycynę, a także *tetL* i *tetO* warunkujących oporność na tetracyklinę. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał obecności genów *vanA* i *vanB* warunkujących oporność na wankomycynę i inne antybiotyki glikopeptydowe.

Ostatnim etapem badań była przeprowadzona metodą typowania molekularnego ADSRRS fingerprint (Amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites) analiza pokrewieństwa wybranych szczepów *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* wyizolowanych z poszczególnych

gatunków zwierząt rzeźnych i dzików. Do badania wybrano szczepy, które przy użyciu metody MIC zaklasyfikowano do grupy opornych fenotypowo na największą liczbę substancji przeciwdrobnoustrojowych. Spośród gatunku

E. faecalis wybrano łącznie 116 szczepów, natomiast spośród *E. faecium* wybrano 54 szczepy. Analizę przeprowadzono w grupach zależnie od gatunku, z którego pochodziły szczepy, osobno dla *E. faecalis* i *E. faecium*. Wyniki badań pozwoliły wyodrębnić każdorazowo przynajmniej dwie grupy pokrewieństwa, co świadczyć może o różnym źródle pochodzenia badanych szczepów.

Przeprowadzone badania dowiodły, że na tuszach zwierząt rzeźnych i dzików w Polsce powszechnie obecne są bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Największe zagrożenie zdrowia publicznego stanowią szczepy należące do gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* wyizolowane z tuszek drobiu i królików, bowiem najczęściej wykazywały one cechy wielolekooporności (MDR). Istnieje konieczność podjęcia działań w celu poprawy higieny uboju oraz obniżenia częstości występowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* na powierzchni tusz bydła, świń, drobiu, królików i dzików w Polsce, a tym samym ograniczenia ich ewentualnej transmisji do dalszych etapów produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego i konsumentów, ze szczególnym uwzględnieniem wielolekoopornych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium*.

Summary

Bacteria of the *Enterococcus* genus are common microorganisms, categorized as lactic acid bacteria (LAB), which co-form the intestinal microbiota of humans and animals. They are opportunistic in nature, i.e. under certain conditions, usually associated with a change of location in the body, they can become the cause of serious infections and food poisoning. The species of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, especially their strains with multidrug resistance characteristics, are of the greatest public health importance. Over the past few years, bacteria belonging to these two species have gained prominence as agents of human infections that pose great difficulties in therapy.

Livestock are often reservoirs of antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* bacteria, which can be transmitted to humans through food of animal origin. The multi-stage procedure of slaughtering animals carries the risk of microbial contamination of their carcasses and internal organs, and its source can be the gastrointestinal tract of the slaughtered animal, as well as the personnel carrying out slaughter procedures.

The available literature lacks information on the prevalence and drug resistance of *E. faecium* and *E. faecalis* isolated from the carcass surfaces of various species of slaughter animals and wild boar. Hence, the aim of this study was to determine the prevalence of *Enterococcus* bacteria on the surface of cattle and pig carcasses, poultry and rabbit carcasses, as well as wild boar carcasses, from slaughterhouses and game processing plants located in Poland, taking into account the prevalence of two species causing dangerous human infections (*Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*). In

addition, the aim of the study was also to determine their phenotypic and genotypic resistance to antibiotics and to trace the genetic relatedness of *E. faecium* and *E. faecalis* strains isolated from the carcasses of individual slaughter animal species and wild boar.

The first part of the study involved taking swabs from the surfaces of 196 cattle carcasses, 160 pig carcasses, 198 poultry carcasses, 496 rabbit carcasses and 216 wild boar carcasses. Non-selective multiplication of bacteria in buffered peptone water was carried out, followed by culture using Slanetz and Bartley LAB-AGAR selective-differentiation medium. Typical bacterial colonies were subjected to further tests in order to confirm their belonging to the *Enterococcus* genus, i.e. Gram staining, catalase production capacity test, esculin hydrolysis capacity test and growth capacity test in 6.5% NaCl medium. The presence of *Enterococcus* spp. was confirmed on the surface of 1112 tested animals, which accounted for 88% of all tested carcasses. The next step involved a PCR test to identify *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species. In the *Enterococcus* spp. population, 27 strains of *E. faecalis* (13.7% of tested carcasses) and 14 strains of *E. faecium* (7.1% of tested carcasses) were identified from the cattle carcass surface, 41 strains of *E. faecalis* (25.6% of tested carcasses) and 12 strains of *E. faecium* (7.5% of tested carcasses) from the pig carcasses surface, 159 strains of *E. faecalis* (79.9% of carcasses tested) and 11 strains of *E. faecium* (5.5% of carcasses tested) from the poultry carcasses surface, 237 strains of *E. faecalis* (47.8% of carcasses tested) from the rabbit carcasses surface and 63 strains of *E. faecalis* (29.7% of carcasses tested) and 39 strains of *E. faecium* (18.4% of carcasses tested) from the surface of wild boar carcasses.

All *E. faecalis* (n=527) and *E. faecium* (n=76) bacteria were then subjected to phenotypic antibiotic resistance testing (penicillin, ampicillin, erythromycin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, enrofloxacin) using the minimum inhibitory concentration (MIC) method. The results revealed a high percentage of *Enterococcus faecalis* strains showing resistance to tetracycline (80.3%) and erythromycin (66.7%), regardless of the species of animal from which they were isolated, while among *Enterococcus faecium* strains, resistance to enrofloxacin (78.9%) and ciprofloxacin (56.6%) was the most common. Subsequently, all *E. faecalis* and *E. faecium* strains were subjected to multiplex PCR for molecular evaluation of resistance to aminoglycoside antibiotics, macrolides, tetracycline and glycopeptides. The most common antibiotic resistance determinant gene found was the gene responsible for tetracycline resistance *tetM*, which was present in 430 strains of *E. faecalis* (81.6%) and 34 *E. faecium* (44.7%). In addition, the presence of the *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia* gene, which determines resistance to gentamicin and other aminoglycoside antibiotics except streptomycin, was found among the strains tested, *ant(6)-Ia* gene conditioning resistance to streptomycin, *aph(3')-IIIa* gene conditioning resistance to kanamycin, and *ermB* conditioning resistance to erythromycin, as well as *tetL* and *tetO* conditioning resistance to tetracycline. None of the strains tested showed the *vanA* and *vanB* genes conditioning resistance to vancomycin and other glycopeptide antibiotics.

The final step of the study was an affinity analysis of selected *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from individual slaughter animals and wild boars using the ADSRRS fingerprint molecular typing method (Amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites). The strains that were classified phenotypically resistant to the greatest number of antimicrobial substances using the MIC method were selected for the study. A total of 116 strains were selected from the *E. faecalis* species, while 54 strains were selected from *E. faecium*. The analysis was carried out in groups depending on the species from which the strains originated, separately for *E. faecalis* and *E. faecium*. The research results allowed to distinguish at least two affinity groups each time, which may indicate the different source of origin of the tested strains.

The study proved that bacteria of the *Enterococcus* genus are commonly present on the carcasses of slaughter animals and wild boars in Poland. The greatest threat to public health is posed by strains belonging to the *E. faecalis* and *E. faecium* species isolated from poultry and rabbit carcasses, as they most often showed multidrug resistance (MDR) traits. There is a need to take measures aimed at improving slaughter hygiene and reducing the incidence of *Enterococcus* bacteria on the surface of cattle, pig, poultry, rabbit and wild boar carcasses in Poland, and thus reducing their possible transmission to further stages of food production from animal origin and consumers, with a particular focus on multidrug resistant strains of *E. faecalis* and *E. faecium*.

