

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to liczna grupa mikroorganizmów, które z jednej strony są dobrze znanymi komensalami, a z drugiej mogą powodować różnego typu infekcje u zwierząt towarzyszących, gospodarskich i wolno żyjących, a także człowieka. Koagulazododatnie gatunki *Staphylococcus* (ang. coagulase-positive *Staphylococcus* CoPS), kolonizują skórę, błony śluzowe, szczególnie górny odcinek przewodu pokarmowego i dróg oddechowych oraz układ moczowo-płciowy.

Szerokie stosowanie substancji przeciwbakteryjnych, zarówno w terapii, metafilaktyce i produkcji zwierzęcej, znacznie zwiększyło ryzyko rozprzestrzeniania się drobnoustrojów lekoopornych, w tym bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Dlatego w ostatnich latach jednym z największych problemów medycyny weterynaryjnej stała się narastająca lekooporność mikroorganizmów, w tym koagulazododatnich gatunków *Staphylococcus*. Obecnie szczególną uwagę poświęca się metacylioopornym izolatom *Staphylococcus*, u których jednocześnie często występuje także oporność wielolekowa, tj. oporność na co najmniej trzy antybiotyki należące do różnych klas środków przeciwdrobnoustrojowych.

Celem badań przeprowadzonych w niniejszej pracy była ocena występowania koagulazododatnich gronkowców u zróżnicowanych pod względem gatunku, zakresu terapii i statusu zdrowotnego gospodarzy-zwierząt, w aspekcie analizy porównawczej oraz oceny poziomu lekooporności tych drobnoustrojów, a także czynników wirulencji odpowiedzialnych za występowanie infekcji na tle *Staphylococcus*. Obok oceny zagrożenia dla zdrowia publicznego jakie mogą stanowić wielolekooporne i/lub metacyliooporne bakterie, posiadające dodatkowo szeroki panel czynników wirulencji, badania miały na celu określenie w jakim stopniu poszczególne, istotne z epidemiologicznego punktu widzenia klony bakterii, rozprzestrzeniają się pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt. Koagulazododatnie bakterie z rodzaju *Staphylococcus* ze względu na powszechne występowanie u różnych gospodarzy jako komensale, a jednocześnie czynniki infekcyjne wielu chorób o zróżnicowanym obrazie klinicznym, stanowią niezwykle ciekawą i dynamiczną pod względem zmienności grupę drobnoustrojów, która pomimo licznych badań, nadal dostarcza nowych wyzwań. Dlatego również jednym z celów badań była próba wyjaśnienia interakcji między odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza na obecność tych bakterii poprzez analizę ekspresji genów zaangażowanych w ten proces. W tym ostatnim przypadku docelową grupą badawczą były małe przeżuwacze, a celem badań była analiza profilu ekspresji genów cytokin: *IL-1α*, *IL-*

IL-1β, *TNF-α*, *IL-6* oraz genów białek ostrej fazy *SAA*, *Hp* i *Cp* u dwóch grup zdrowych klinicznie owiec: zwierząt nosicieli CoPS z uwzględnieniem ich czynników wirulencji, oraz owiec, u których nie wykazano obecności CoPS.

Całościowa analiza profilu lekooporności wykazała, iż najczęściej szczepów CoPS było opornych na tetracyklinę (n=160), penicylinę (n=141), klindamycynę (n=128) oraz erytromycynę (n=117). Profil oporności fenotypowej na ogół korelował z obecnością genów, głównie *tetM* oraz *blaZ*.

Zaobserwowano również relatywnie wysoki odsetek oporności na oksacylinę i cefoksytynę, w zależności od gatunku CoPS, przede wszystkim u psów (n=4 *S. aureus* i n=17 *S. pseudintermedius*) oraz owiec (n=5 *S. aureus*). W przypadku obu grup zwierząt szczepy izolowano z różnych miejsc, głównie błony śluzowej jamy ustnej. Ponadto trzy szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę izolowane od owiec i psów dodatkowo wykazały oporność na wankomycynę.

Przeprowadzone badania wykazały również bogaty profil genów wirulencji. Jednakże, najczęściej szczepów *S. aureus* wyizolowanych od wszystkich grup zwierząt, w tym wolno żyjących, posiadało gen wirulencji *seB*, kodujący jedną z enterotoksyn (n=76) oraz *LukE-LukD*, kodujący leukotoksynę *LUKE/LUKD* (n=63). W przypadku gatunku *S. pseudintermedius* najczęściej szczepów pochodzących wyłącznie od zwierząt towarzyszących posiadało gen *seL* (n=69) ale warto zauważyć, że geny takie jak *lukS-lukF*, kodujące komponenty leukocydyny, *icaA*, *icaD*, kodujące komponenty biofilmu, *siet*, kodujący toksynę eksfoliatywną oraz *Sec canine* odpowiedzialny za kodowanie jednej z enterotoksyn, występowały niemalże równie często (po 68 szczepów posiadało wcześniej wspomniany gen wirulencji). Ponadto na podstawie analizy MLST zidentyfikowano nowe ST (typy sekwencyjne) u trzech szczepów MRSA wyizolowanych od owiec (ST 9313, ST 9314 i ST 9315) oraz w dwóch izolatach MRSA od psów (ST9311, ST9312) i czterech izolatach *S. pseudintermedius*: ST 2739, ST 2740, ST 2741, ST 2742, również pochodzących od psów. Ponadto szczepy wyizolowane od zwierząt gospodarskich oraz szczepy wyizolowane od zwierząt towarzyszących zostało przeanalizowanych z wykorzystaniem metody ADSRRS-fingerprinting, w celu porównania ich profili genomowych. Metoda ta okazała się przydatna w przypadku szczepów izolowanych od owiec, wskazując na rozprzestrzenianie się szczepów o takim samym genotypie wśród zwierząt-gospodarzy należących do tego samego stada. W przypadku małych przeżuwaczy przeprowadzono dodatkowe badania i porównano ekspresję czterech genów cytokin i trzech

genów białek ostrej fazy w leukocytach owiec- nosicieli *S. aureus* i bez obecności *S. aureus* (kontrola): *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *SAA*, *Hp* i *Cp*. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost zarówno *IL-6*, jak i *Hp* w czasie ciąży w leukocytach owiec rasy Uhruska, u których wykazano nosicielstwo *S. aureus*. Podobne tendencje zaobserwowano u owiec rasy Świniarka, ale różnice nie zostały potwierdzone statystycznie.

Podsumowując wyniki uzyskanych badań, wykazano, iż zwierzęta gospodarskie, towarzyszące oraz wolno żyjące są nadal ważnym rezerwuarem koagulazododatnich szczepów, tj. *S. pseudintermedius* i *S. aureus*. Przeprowadzone analizy wykazały również, iż bez względu na gatunek zwierzęcia, najbardziej predylekcyjnym miejscem występowania CoPS jest błona śluzowa jamy ustnej. Należy podkreślić, iż w wielu przypadkach ten sam gospodarz może być nosicielem kilku zróżnicowanych pod względem genomu, w tym profilu oporności i wirulencji oraz typu sekwencyjnego szczepów CoPS, należących do tego samego gatunku. Warto wskazać, iż zwierzęta wolno żyjące pomimo teoretycznie niskiej presji selekcyjnej ze względu na brak stosowania celowanej terapii, również stanowią źródło lekoopornych i wirulentnych szczepów CoPS. W przypadku zwierząt towarzyszących i gospodarskich na szczególną uwagę zasługuje obecność szczepów MRSA, MRSP, szczepów wankomycynoopornych oraz szczepów wielolekoopornych, a biorąc pod uwagę bliski kontakt z człowiekiem, rezerwuary te stanowią źródło szczepów stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Ponadto bogaty profil genów wirulencji w przypadku obu gatunków, szczególnie manifestujący się obecnością genów kodujących enterotoksyny, toksyny eksfoliatywne i toksynę szoku toksycznego, mających właściwości superantygenów dodatkowo może sprzyjać rozwojowi infekcji o ciężkim przebiegu zarówno u samych gospodarzy jak i u człowieka. Wykazanie nowych typów sekwencyjnych (ST), szczególnie wśród szczepów MRSA i MRSP oraz narastająca dominacja ST, dotychczas mających niewielkie znaczenie epidemiologiczne, wskazuje na ciągłą ewolucję oraz rozwijanie nowych mechanizmów adaptacyjnych szczepów CoPS do nowych gospodarzy i nowych środowisk, co przy bogatym panelu czynników oporności i wirulencji, czyni tę grupę bakterii wciąż niepoznanym w pełni zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Co więcej, pomimo potwierdzonego statusu komensala u zwierząt, obecność gatunków CoPS nawet bez generowania objawów klinicznych infekcji aktywuje układ odpornościowy gospodarza o czym świadczą statystycznie istotnie wyższe poziomy *IL-6* i *Hp* u nosicieli *S. aureus*, szczególnie u zwierząt w okresie ciąży.

Słowa kluczowe: koagulazododatnie *Staphylococcus*, lekooporność, wirulencja, Jedno Zdrowie, zwierzęta