

Teresa KRZYŚKO-LUPICKA¹, Magdalena KRĘCIDŁO¹, Magdalena MYSŁEK¹
i Łukasz KRĘCIDŁO¹

ŚRODOWISKO A ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ IZOLATÓW *Escherichia coli*

ENVIRONMENTAL DISSEMINATION OF RESISTANCE AMONG *Escherichia coli* ISOLATES

Abstrakt: Pula farmaceutyków w środowisku powiększa się w wyniku kontaminacji wód, gruntów, ścieków, a także surowców pochodzenia zwierzęcego. Obecność antybiotyków w środowisku wpływa nie tylko na zahamowanie rozwoju mikroorganizmów, ale w stężeniu subinhibicyjnym może stymulować ekspresję genów wywołujących zjawisko antybiotykooporności. Celem pracy było porównanie wrażliwości na antybiotyki pałeczek *Escherichia coli* wyizolowanych z surowego mleka i zmieszanych odpadów drobiarskich. Materiał badawczy stanowiły szczepy *E.coli* wyizolowane z surowca mleczarskiego i zmieszanych odpadów drobiarskich. Ocenę wrażliwości izolatów na antybiotyki przeprowadzono metodą Kirby-Bauera. Profil oporności *E. coli* ustalano na podstawie rekomendacji CLSI. Wykorzystano krążki firmy BTL wysycone takimi antybiotykami, jak: ampicylina (AM10), chloramfenikol (C30), gentamycyna (CN10), tetracyklina (TE30) oraz mieszaniną sulfmetoksazolu i trimetoprimu (SXT25). Izolaty *E. coli* z surowca mleczarskiego charakteryzowały się większą opornością na ampicylinę i wyższą wrażliwością na pozostałe badane antybiotyki w porównaniu do izolatów z odpadów drobiarskich.

Słowa kluczowe: metoda Kirby-Bauera, testowanie antybiotykooporności, *Escherichia coli*

Wprowadzenie

Oporność mikroorganizmów na substancje antymikrobiologiczne (antimicrobial resistance - AMR) stanowi poważne zagrożenie dla światowego systemu zdrowia publicznego. Skażenie środowiska farmaceutykami powiększa się w wyniku nieprawidłowego lub nadmiernego stosowania substancji antymikrobiologicznych oraz problemów z ich utylizacją i usuwaniem ze ścieków. Substancje stosowane w lecznictwie i weterynarii, takie jak substancje aktywne leków, substancje nośne występujące w lekach, suplementy i nutraceutyki zaliczane są do tzw. *Pharmaceuticals and Personal Care Products* (PPCPs) [1]. W konsekwencji coraz więcej wód, gruntów, ścieków oraz surowców pochodzenia zwierzęcego ulega skażeniu lekami, w tym antybiotykami [2]. Pod względem chemicznym antybiotyki stanowią bardzo różnorodną grupę substancji, do której zalicza się chinolony, makrolidy, sulfonamidy i tetracykliny [3]. Antybiotyki są stosowane głównie do leczenia chorób infekcyjnych u ludzi i zwierząt, ale niestety w niektórych krajach są stosowane jeszcze jako promotory wzrostu trzody chlewnej, drobiu i w hodowlach ryb [4].

Do środowiska dostają się wraz ze ściekami z produkcji leków, składowisk odpadów, w wyniku nieprawidłowej utylizacji leków w gospodarstwach domowych i szpitalach, z obornikiem i gnojowicą oraz pozostałościami pasz zawierających antybiotyki [3-5]. Ich obecność stwierdza się w oczyszczonych ściekach, wodach powierzchniowych

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6, 45-092 Opole, email: teresak@uni.opole.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'16, Zakopane, 5-8.10.2016

i gruntowych, a także w osadach dennych i glebie. Farmaceutyki mogą być wydalone do środowiska w postaci niezmienionej lub w postaci metabolitów [2, 5], a dodatkowo mogą być produktami metabolizmu mikroorganizmów bytujących w środowisku.

Wzrost spożycia leków, zarówno substancji leczniczych, jak i powstających produktów ich rozkładu oraz półproduktów stosowanych w produkcji, może wywoływać nieodwracalne skutki w środowisku prowadzące do wzrostu liczby lekoopornych szczepów. Obecne w środowisku wzrostu drobnoustrojów antybiotyki selekcionują oporne mutanty, noszące geny lekooporności. Częstość mutacji w tkankach organizmów wyższych, wodach i glebach wzmagają antybiotyki w stężeniach subinhibicyjnych, tzn. w stężeniach niższych niż stężenia hamujące wzrost drobnoustrojów. W komórkach bakterii pod wpływem subinhibicyjnych stężeń antybiotyków wzrasta częstość mutacji, ale też dochodzi do intensyfikacji przenoszenia genów między komórkami w wyniku horyzontalnego transferu, co powoduje rozprzestrzenianie się genów lekooporności. Stężenia takie w znaczący sposób wpływają na aktywność wielu genów bakteryjnych przez zmianę poziomu ich transkrypcji. Okazuje się jednak, że nawet bakterie, które nie były poddawane takiej presji selekcyjnej, stawały się oporne. Przyczyną tego zjawiska jest istnienie horyzontalnego transferu genów między drobnoustrojami, który za pomocą mobilnych elementów genetycznych może zachodzić również między gatunkami niespokrewnionymi ze sobą i obejmuje także drobnoustroje środowiskowe oraz komensalne [5-7].

Szybkie rozprzestrzenianie się genów lekooporności wśród chorobotwórczych szczepów bakterii przekłada się na wzrost zachorowań i zgonów ludzi. Bakterie antybiotykooporne mogą rozprzestrzeniać się i przenosić pomiędzy środowiskiem, zwierzętami a człowiekiem, co więcej, wydaje się, że nie ma bariery gatunkowej, która zatrzymuje transfer genów antybiotykoodporności pomiędzy mikroorganizmami. Z tego względu szczepy bakterii infekcyjnych dla człowieka lub zwierząt mogą nabyć geny antybiotykoodporności od izolatów środowiskowych, które wykazują znacznie większą oporność na antybiotyki niż bakterie zoonotyczne wyizolowane od zwierząt [6-8].

Ze względu na możliwości oddziaływania substancji antybiotycznych na organizmy żywe należy podjąć działania mające na celu monitorowanie obecności tych związków w różnych środowiskach. Istotnym zagadnieniem jest również dokładne poznanie ekologii bakterii opornych na środki antimikrobiologiczne oraz wyznaczenie genów oporności wraz z ich lokalizacją w genomie bakteryjnym lub na mobilnych elementach genetycznych [8].

Kluczowe jest monitorowanie zwłaszcza bakterii z grupy ESKAPE, do których zaliczane są gatunki *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa* i bakterie rodziny Enterobacteriaceae. Stanowią one grupę bakterii powodujących trudne do wyleczenia i niebezpieczne zakażenia szpitalne [7].

Powszechnie w ocenie sanitarnej środowiska, surowców i produktów żywnościowych są stosowane mikrobiologiczne indykatory, takie jak pałeczki jelitowe należące do rodziny Enterobacteriaceae, a zwłaszcza monitoruje się liczebność *Escherichia coli*. Bakterie te są nie tylko dobrym wskaźnikiem stanu sanitarnego, ale odgrywają również rolę indykatora zużycia antybiotyków stosowanych w weterynarii [9].

Celem pracy było porównanie wrażliwości na antybiotyki pałeczek *Escherichia coli* wyizolowanych z mleka surowego i zmieszanych odpadów drobiarskich.

Metodyka badań

Materiał do badań stanowiło 19 izolatów *E. coli* wyizolowanych z mleka surowego, stanowiącego surowiec mleczarski, oraz 20 izolatów *E. coli* z odpadów drobiarskich.

Próbki do badań pobierano czterokrotnie, w odstępach miesięcznych w okresie od kwietnia do lipca 2016 roku.

Odpad drobiarski do analiz mikrobiologicznych został wymieszany w sterylnych plastikowych torebkach, a następnie 5 g odpadu zostało zawieszono w 45 cm³ wody destylowanej z 0,01% Tweenu 80. Tak przygotowane próby były worteksowane przez 1 minutę, a następnie pozostawione do opadnięcia fazy stałej [9].

Mleko surowe pobierano ze zlewni w zakładach mleczarskich i transportowano z zachowaniem łańcucha chłodniczego. Próby do analiz przygotowano zgodnie z PN-EN ISO 707:2009 i PN-EN ISO 6887-5:2010 [10, 11].

Ogólną liczbę bakterii z grupy coli oznaczono na podłożu Endo (BTL, Polska), liczebność glukuronidazo dodatnich szczepów *E. coli* oznaczono na podłożu TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar-BTL, Polska). Identyfikację izolatów potwierdzano na podstawie testów biochemicznych [12]. Oznaczenia wykonano w czterech powtórzeniach.

Do oceny wrażliwości na antybiotyki stosowano 24-godzinne hodowle, które inkubowano w 37°C na podłożu tryptozowo-sojowym (TSA-BTL, Polska). Komórki bakterii zawieszano w roztworze PBS (0,8 dm³ H₂O; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄) uzyskując, inokulum o gęstości 2·10⁸ jtk·cm⁻³.

Ocenę wrażliwości na antybiotyki przeprowadzono metodą Kirby-Bauera w podłożu Mueller-Hinton (Biomaxima, Polska) z wykorzystaniem krążków antybiotykowych (BTL, Polska) zawierających substancje z grupy penicylin - ampicylina (AM 10 µg), aminoglikozydów - gentamycyna (CN 10 µg), fenikoli - chloramfenikol (C 30 µg), tetracyklin - tetracyklina (TE 30 µg) oraz makrolidów - mieszanina sulfmetoksazolu i trimetoprimu (SXT25).

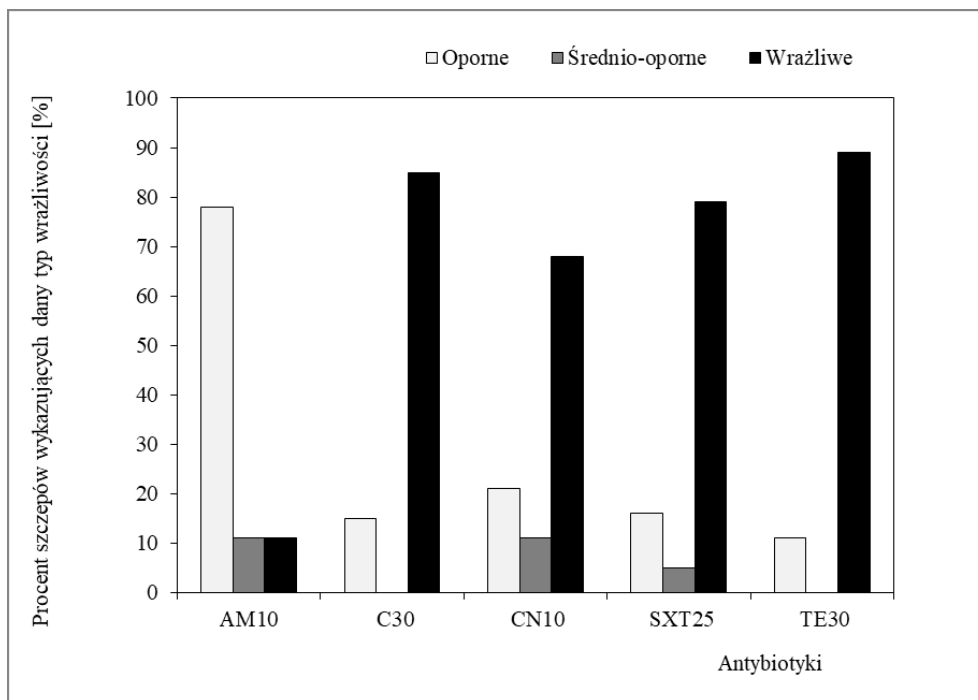
Profil oporności izolatów ustalano na podstawie rekomendacji EUCAST [13]. Multioporność na antybiotyki ustalono dla izolatów, które wykazywały fenotyp oporności na przynajmniej trzy substancje należące do różnych grup.

Wyniki badań

Jednym z ważnych problemów związanych ze zjawiskiem oporności bakterii jest nieracjonalne stosowanie antybiotyków, a także środków dezynfekcyjnych. Ograniczenia regulujące sposób dawkowania antybiotyków są niewystarczające, gdyż coraz powszechniej w środowisku stwierdza się obecność szczepów lekoopornych. Bakterie komensale, do których należy *Escherichia coli*, stanowią „zbiornik” genów oporności na antybiotyki. Ich poziom oporności jest więc dobrym wskaźnikiem wskazującym na presję selekcyjną w wyniku zastosowania antybiotyków [14].

Bakterie *E. coli*, w zależności od środowiska, z którego zostały wyizolowane, wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na antybiotyki. Izolaty z surowca mleczarskiego największą oporność wykazywały na ampicylinę (78%), a wrażliwość na pozostałe testowane antybiotyki. Przy czym na tetracyklinę, chloramfenikol i mieszaninę sulfmetoksazolu i trimetoprimu wrażliwość wykazywało od 80-90% badanych izolatów, a na gentamycynę - 70% (rys. 1).

Z monitoringu rozprzestrzeniania się antybiotykooporności, który raportuje Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), można wnioskować, że podobnie jak w przeprowadzonych badaniach izolaty odzwierzęce wykazują oporność na tetracyklinę (50 i 49%) oraz cyprofloksacynę (60 oraz 62%). Oporność na gentamycynę odzwierzęcych szczepów *E. coli* wynosi od 1% (izolaty od bydła) do 7% (izolaty od kury domowej). Szczepy środowiskowe wykazują podobną oporność jak odzwierzęce w stosunku do tetracykliny i cyprofloksacyny, natomiast nie wykazują oporności na gentamycynę [15].



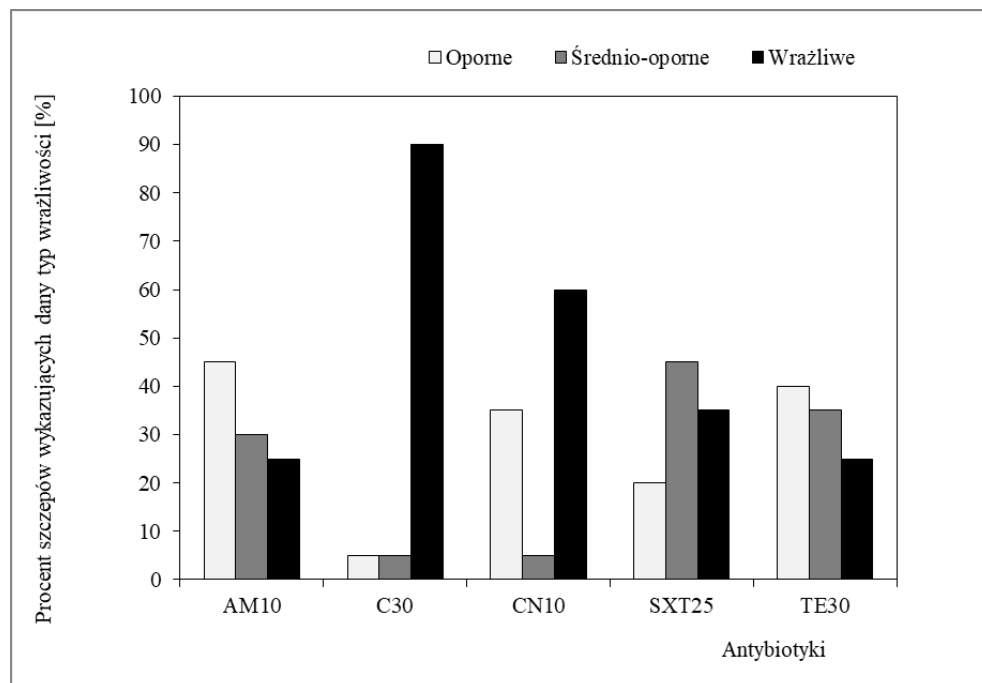
Rys. 1. Wrażliwość izolatów *Escherichia coli* z surowego mleka na antybiotyki (ampicylina - AM10, chloramfenikol - C30, gentamycyna - CN10, sulfmetoksazol/trimetoprim - SXT25, tetracyklina - TE30)

Fig. 1. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from raw milk on antibiotics (ampicillin - AM10, chloramphenicol - C30, gentamicin - CN10, sulfamethoxazole/trimethoprim - STX25, tetracycline - TE30)

Izolaty *E. coli* z odpadów drobiarskich największą oporność wykazywały na ampicylinę i tetracyklinę (40-45,0%), a wrażliwość na chloramfenikol - 90,0% i gentamycynę (rys. 2). Najczęściej wykrywana jest oporność na tetracykliny, aminopenicyliny i sulfonamidy stosowane w weterynarii [4]. Wysoka oporność na te antybiotyki może być wynikiem częstego stosowania ich w praktyce weterynaryjnej. Potwierdza to także doniesienie Kaesbohnera i in. [16] o oporności szczepów *E. coli* na co najmniej jeden antybiotyk. Po przeprowadzeniu testów antybiotykooporności dla 1462 komensalnych szczepów *E. coli* pochodzenia odzwierzęcego podają, że oporność na co najmniej jeden antybiotyk wykazywało 68%, a 57% wykazywało multioporność na

antybiotyki. Największa liczba izolatów wykazywała oporność na tetracykliny i cyprofloksacynę [16].

Bartoszewicz i in. podają, że 21% izolatów *E.coli* z cieków wodnych było opornych na chloramfenikol, 41,2% na tetracyklinę, a 90,4% na gentamycynę [17].



Rys. 2. Wrażliwość izolatów *Escherichia coli* z odpadów drobiarskich na antybiotyki (ampicylina - AM10, chloramfenikol - C30, gentamycyna - CN10, sulfmetoksazol/trimetoprim - SXT25, tetracyklina - TE30)

Fig. 2. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from poultry wastes on antibiotics (ampicillin - AM10, chloramphenicol - C30, gentamicin - CN10, sulfamethoxazole/trimethoprim - STX25, tetracycline - TE30)

Środowiskowe szczepy *E. coli* stanowią zagrożenie dla człowieka nie tylko ze względu na wysoką oporność na antybiotyki i sulfonamidy, ale także olejki eteryczne, takie jak olejek herbaciany, kminkowy, cytrynowy, oregano i lemongrasowego. Jedynie olejek tymiankowy, w stężeniach 1,0 i 1,5%, może stanowić alternatywę w procesach higienizacji środowiska [18].

Zanieczyszczenie środowiska antybiotykami zwiększa ryzyko rozprzestrzeniania się antybiotykooporności wśród bakterii. Bakterie *E. coli* w większości zaliczane są do potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi. Jednak w wyniku mutacji oraz wymiany genów powstało kilka szczepów, które mają zdolności chorobotwórcze; od łagodnie chorobotwórczych, wywołujących jedynie lekkie zakażenia pokarmowe, do zjadliwych, powodujących groźne krwawe biegunki z powikłaniami grożącymi zakażeniem krwi. Tym ostatnim nadano nazwę enterokrwotocznych *E. coli* (ang. EHEC - enterohemorrhagic *Escherichia coli*) [19].

Jednym z ważnych problemów dotyczących zjawiska oporności wśród bakterii jest rozprzestrzenianie się oporności nabytej związanej z nieracjonalną antybiotykoterapią lub nieprawidłowym stosowaniem środków dezynfekcyjnych. Ograniczenia regulujące sposób dawkowania antybiotyków nie zawsze mają zastosowanie przy użyciu preparatów dezynfekcyjnych. Stężenia środków dezynfekcyjnych są zwykle o wiele wyższe niż stosowane stężenia antybiotyków.

Wnioski

- Izolaty *E. coli* wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na antybiotyki w zależności od środowiska z jakiego zostały wyizolowane.
- Izolaty *E. coli* z surowca mleczarskiego charakteryzowały się większą opornością na ampicylinę i wyższą wrażliwością na pozostałe badane antybiotyki (z wyjątkiem chloramfenikolu), w porównaniu do izolatów z odpadów drobiarskich.
- Niezależnie od środowiska izolacji testowane szczepy wykazywały podobną wrażliwość na chloramfenikol.

Literatura

- [1] Musloff A, Leschik S, Schafmeister MT, Reinstorf F, Strauch G, Krieg R, et al. Evaluation of xenobiotic impact on urban receiving waters by means of statistical methods. *Water Sci Technol*. 2010;62(3):684-92. DOI: 10.2166/wst.2010.930.
- [2] Kümmerer K. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:311-320. DOI: 10.1093/jac/dkh325.
- [3] Szymonik A, Lach J. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inż Ochr Środ*. 2012;15(3):249-263.
- [4] Merle R, Hajek P, Kasbohrer A, Hegger-Gravenhorst C, Mollenhauer Y, Robanus M, et al. Monitoring of antibiotic consumption in livestock: a German feasibility study. *Vet Med*. 2011;104(1-2):34-43. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.10.013.
- [5] Zabłotni A, Jaworski A. Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna. *Postępy Hig Med Dośw*. 2014;68:1040-1049. <http://docplayer.pl/20895651-Zrodla-antybiotykow-w-srodowiskach-naturalnych-i-ich-rola-biologiczna-sources-of-antibiotics-in-natural-environments-and-their-biological-role.html>.
- [6] Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics*. 2017;6:12:1-38. DOI: 10.3390/antibiotics6020012.
- [7] Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutri*. 2017;57(13):2857-2876 DOI: 10.1080/10408398.2015.1077192.
- [8] Pavlickov S, Klancni A, Dolezalov M, Mozina SS, Holko I. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. *J Environ Sci Health*. 2017;11:1-7. DOI: 10.1080/03601234.2017.1318637.
- [9] Graham JP, Evans SL, Price LB, Silbergeld EK. Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environ Res*. 2009;109(6):682-689. DOI: 10.1016/j.envres.2009.05.005.
- [10] PN-EN ISO 707:2009: Mleko i przetwory mleczne -- Wytyczne do pobierania próbek. <http://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-707-2009p.html>.
- [11] PN-EN ISO 6887-5:2010: Mikrobiologia żywności i pasz -- Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych -- Część 5: Specyficzne zasady przygotowania mleka i przetworów mlecznych. <http://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-6887-5-2010p.html>.
- [12] Szewczyk EM, redaktor. *Diagnostyka bakteriologiczna*. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2013. ISBN: 9788301160609.
- [13] Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter J. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect (CMI)*. 2014;20(4):0255-0266. DOI: 10.1111/1469-0691.12373.

- [14] Uddin-Rasheed M, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(4):341-346. DOI: 10.1590/S0036-46652014000400012.
- [15] European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2009. *EFSA J*. 2001;9(7):104-129. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2154.
- [16] Kaesbohrer A, Schroeder A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B, Appel B. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health*. 2012;59(Suppl.2):158-165. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1863-2378.2011.01451.x/epdf>.
- [17] Bartoszewicz M, Michalska M, Cieszyńska M. Antybiotykooporność bakterii heterotroficznych jako skutek zanieczyszczenia środowiska. *Med Środ*. 2014;17(4):38-46. http://www.medycynasrodowiskowa.pl/Downloads/File/2014v4/MS_2014-4_4.pdf.
- [18] Krzyśko-Łupicka T, Mysiek M, Błaszczyk K. Wrażliwość na olejki eteryczne środowiskowych lekkoopornych szczepów *Escherichia coli*. *Proc ECOpole*. 2015;9(2):633-638. DOI: 10.2429/proc.2015.9(2)074
- [19] Lebkowska M. Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochr Środ*. 2009;31(2):11-15. http://www.os.not.pl/docs/czasopismo/2009/Lebkowska_2-2009.pdf.

ENVIRONMENTAL DISSEMINATION OF RESISTANCE AMONG *Escherichia coli* ISOLATES

Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole, Opole

Abstract: Recently amount of pharmaceutical substances in the environment is getting higher due to spreading and relocation of water and soil contamination by sources such as a livestock production or sewage. The persistence of antibiotic in the environment may affect both the inhibition of microbial growth and also the stimulation of resistance genes expression, when antibiotics are in the subinhibitory concentration. The purpose of a study was to compare susceptibility of *Escherichia coli* isolates from two following sources: a raw milk from dairy and a poultry waste. The assessment of susceptibility on antibiotic was carried out by the Kirby-Bauer's method. The resistance profile of isolates was estimated with using of CLSI standards. Antibiotic discs from BTL company were tested with particular type of substances: ampicillin (AM10), chloramphenicol (C30), gentamicin (CN10), tetracycline (TE30) and solution of sulfamethoxazole and trimethoprim (SXT25). Isolates of *E. coli* from raw milk were more resistant to ampicillin and characterised by higher susceptibility to the other antibiotics in the comparison to the isolates from poultry waste.

Keywords: Kirby-Bauer method, antibiotic susceptibility testing, *Escherichia coli*