

Łukasz Mąka

„Analiza wybranych mechanizmów lekooporności szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych z żywności w latach 2008-2013”

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych

Dyscyplina: biologia medyczna

Promotor: dr hab. Magdalena Popowska, prof. UW

Promotor pomocniczy: dr n. med. Aleksandra Januszkiewicz

STRESZCZENIE

Aktualnie jednym z największych wyzwań w medycynie jest lekooporność, szczególnie w odniesieniu do szczepów bakterii chorobotwórczych. Na całym świecie infekcje związane z bakteriami opornymi na antybiotyki i chemioterapeutyki zwiększają koszty leczenia, a niejednokrotnie są przyczyną śmierci pacjentów.

Lekooporne bakterie są coraz częściej izolowane z surowców i środków spożywczych, również żywności dostępnej na rynku, co potwierdzają doniesienia piśmiennictwa. Zwiększa się nie tylko częstość ich występowania, ale także zakres leków wobec których wykazują oporność.

W związku z powyższym, istotne było podjęcie badań, które pozwolą stwierdzić, czy omawiany problem dotyczy pałeczek *Salmonella* spp. wyizolowanych z żywności pochodzącej z rynku krajowego. Od wielu lat *Salmonella* spp. jest jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi w Polsce i w Europie.

Celem podjętych badań było określenie poziomu lekooporności wśród pałeczek *Salmonella* spp. izolowanych z żywności na terenie Polski w latach 2008 – 2013, a także zbadanie wybranych mechanizmów oporności wraz z wykryciem elementów genetycznych jako nośników zidentyfikowanych determinant oporności. Dodatkowym celem było ustalenie stopnia genetycznego podobieństwa badanych lekoopornych izolatów, rozpowszechnionych na terenie Polski.

Przedmiot badań stanowiło 241 szczepów *Salmonella* spp., z kolekcji Zakładu Bezpieczeństwa Żywności NIZP-PZH, wyizolowanych w większości z żywności, w latach

2008 - 2013, opornych na co najmniej jeden antybiotyk lub chemioterapeutyk. Ich lekooporność potwierdzano określając minimalne stężenia antybiotyku lub chemioterapeutyku hamującego wzrost drobnoustrojów (ang. MIC). Typ serologiczny badanych izolatów *Salmonella* spp. określano w akredytowanym laboratorium Zakładu Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny. Geny związane z lekoopornością identyfikowano z zastosowaniem amplifikacji PCR wykorzystując startery opracowane na podstawie piśmiennictwa światowego.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że oporność na aminoglikozydy wykazywało 36,9% lekoopornych izolatów *Salmonella* spp. Zidentyfikowano u nich geny oporności na streptomycynę: *aadA* (59,6%), *strA* (40,5%), *strB* (39,3%) oraz gentamycynę: *aadB* (50%). Oporność na antybiotyki β -laktamowe stwierdzono u 30,7% izolatów lekoopornych. U 89,2% izolatów opornych na β -laktamy zidentyfikowano gen *bla*_{TEM} (TEM-1, TEM-2). Stosując tzw. test dwóch krążków nie stwierdzono, by którykolwiek z badanych izolatów wytwarzał β -lakamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL).

Największy odsetek (75,1%) stanowiły pałeczki *Salmonella* spp. odporne na chinolony i fluorochinolony. Wśród nich 5,5% posiadało geny *qnrB19* i *qnrS1*. W celu zbadania obecności mutacji w obrębie *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, otrzymane sekwencje nukleotydowe przepisano na sekwencje aminokwasowe i porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank. Zidentyfikowano 10 różnych substytucji aminokwasów w czterech badanych genach, z czego większość w *gyrA* i *parC*.

Oporność na tetracykliny wykazywało 39,0% badanych izolatów *Salmonella* spp., wśród których 93,6% posiadało co najmniej jeden z genów: *tetA*, *tetB* lub *tetG*.

Oporność na sulfonamidy stwierdzono u 41,5% lekoopornych izolatów. Wśród nich 49,0% posiadało gen *sul1*, a 42,0% - *sul2*.

Wśród lekoopornych izolatów *Salmonella* spp. 2,5% wykazywało oporność na trimetoprim, natomiast u połowy z nich zidentyfikowano gen *dhfrI*.

Oporność na chloramfenikol stwierdzono u 3,3% izolatów opornych na co najmniej jeden lek. U wszystkich z nich zidentyfikowano gen *floR*.

W badaniach zidentyfikowano łącznie 14 różnych genów oporności: *aadA*, *strA*, *strB*, *aadB*, *bla*_{TEM}, *qnrB*, *qnrS*, *tetA*, *tetB*, *tetG*, *sul1*, *sul2*, *dhfrI*, *floR*;

W celu zbadania lekoopornych izolatów w kierunku obecności integronów klasy 1, identyfikowano gen kodujący integrazę *intI*. Stwierdzono, że integrony te występują u 24,5% lekoopornych pałeczek *Salmonella* spp.

Plazmidy o wielkości w zakresie od ok. 2 kpb do powyżej 90 kpb zidentyfikowano u 88,4% izolatów. Ponadto u 44,4% badanych izolatów potwierdzono zdolność przekazywania genów oporności na drodze koniugacji.

Obecność genów oporności w DNA plazmidowym potwierdzono dla wszystkich izolatów, u których wykryto geny *qnrB*, *qnrS*, *aadA*, *aadB*, oraz *bla*_{TEM}. Wśród izolatów posiadających *sul1* i *sul2* potwierdzono ich obecność w DNA plazmidowym odpowiednio u 95,9% oraz u 81,0%, natomiast geny *strA* zidentyfikowano u 72,2%, a *strB* u 94,3% badanych izolatów.

Ponadto określono genetyczne podobieństwo lekoopornych izolatów *Salmonella* spp. należących do wybranych typów serologicznych, przeprowadzając makrorestrykcyjną analizę polimorfizmu genetycznego DNA z zastosowaniem endonukleazy XbaI.

Otrzymano 24 profile REA-PFGE izolatów *Salmonella* Enteritidis, 4 profile *S. Derby*, 5 profili *Salmonella enterica* subsp. *enterica* : 1,4,[5],12:i:-, 5 profili *Salmonella* Hadar, 2 profile *S. Kentucky*, 18 różnych profili dla izolatów *S. Infantis*, 1 profil *S. Mbandaka*, 1 profil *S. Schwarzengrund* oraz 7 odrębnych profili *Salmonella* Typhimurium.

Przedstawione w pracy wyniki badań wskazują na wzrost, w latach 2008 – 2013, częstości występowania lekoopornych pałeczek *Salmonella* spp. wyizolowanych z żywności pochodzącej z obrotu. Choć większość z nich pochodzi z produktów mięsnych przeznaczonych do obróbki termicznej, to istnieje ryzyko ich wprowadzenia i rozprzestrzenienia w środowisku kuchennym.

Wykazana w badaniach lokalizacja genów lekooporności na plazmidach i ich zdolność do przekazywania drogą horyzontalnego transferu genów do innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (*E. coli*), potwierdza możliwość rozprzestrzeniania się lekooporności.

Wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań w zakresie monitoringu lekooporności izolatów *Salmonella* spp., wyizolowanych z żywności pochodzącej z obrotu, na które bezpośrednio narażeni są konsumenci. Ponadto różnorodność zidentyfikowanych w badaniach plazmidów czy integronów będących nośnikami genów lekooporności, wskazuje na potrzebę dalszych badań, których celem będzie pełna ich charakterystyka.

Uzyskane wyniki są istotnym elementem, który może być wykorzystany w ocenie potencjalnego ryzyka związanego ze spożyciem zanieczyszczonej żywności opornymi szczepami *Salmonella* spp. co jest bardzo istotne dla bezpieczeństwa zdrowotnego ludności.

Informacje dotyczące zarówno częstości występowania lekooporności jak i mechanizmów z nią związanych mogą być cennymi wskazówkami ukazującymi tendencje

w rozwoju lekooporności. Jest to szczególnie ważne z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia publicznego.

Znaczną część przedstawionych w pracy badań zrealizowano w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki „Preludium” DEC-2011/01/N/NZ9/00197 „Badanie oporności szczepów *Salmonella* wyizolowanych z żywności na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki” pod opieką p. dr hab. Magdaleny Popowskiej, prof. UW.