

Charakterystyka *Enterobacteriales* produkujących beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowych izolowanych z mięsa wieprzowego

STRESZCZENIE

Antybiotykooporność wśród bakterii jest ciągle narastającym problemem zarówno w medycynie, jak i weterynarii. Zwierzęta hodowlane oraz mięso pochodzące z ich uboju są często źródłem bakterii lekoopornych. Zdolność do produkcji beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) jest powszechna wśród bakterii z rzędu *Enterobacteriales*, w tym wśród bakterii komensalnych. Bakterie te stanowią w dużej mierze ignorowany rezerwuuar genów ESBL. Celem pracy była ocena lekowrażliwości niepatogennych izolatów *Enterobacteriales* uzyskanych z mięsa wykorzystywanego w produkcji żywności. Z badanych 100 próbek mięsa selektywnie na podłożu chromogennym wyizolowano 18 szczepów *Enterobacteriales*. Zidentyfikowane do gatunku izolaty poddano analizie pod kątem oporności na antybiotyki metodami fenotypowymi (z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej) oraz molekularnymi w celu identyfikacji genów *bla* (z wykorzystaniem techniki PCR). Wśród badanych szczepów wykazano oporność typu ESBL – 13 z 18 (72%) badanych izolatów okazało się być szczepami wytwarzającymi ESBL. Spośród nich osiem posiadało gen CTX-M, trzy gen TEM i jeden gen SHV.

WPROWADZENIE

Odkrycie antybiotyków oraz ich zastosowanie jest uważane za jedno z najważniejszych osiągnięć medycyny. Związki, które zaczęto stosować w leczeniu przeciwdrobnoustrojowym zrewolucjonizowały XX-wieczną medycynę. Jednak zdolność mikroorganizmów do nabywania oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe szybko przewyżyła wszelkie wyobrażenia i oczekiwania, doprowadzając do sytuacji, kiedy niektóre z antybiotyków używanych z powodzeniem w przeszłości, nie znajdują już zastosowania w dzisiejszej medycynie [1,2].

Bakterie z łatwością adaptują się do zmieniających się warunków środowiska, w tym takich, w których pojawiają się czynniki bójcze – antybiotyki [3,4]. Środki przeciwdrobnoustrojowe są często stosowane w produkcji zwierzęcej w celu utrzymania zdrowia i produktywności, tworząc przy tym presję selekcyjną sprzyjającą pojawianiu się bakterii lekoopornych. Bakterie te rozprzestrzeniając się między zwierzętami wymieniają geny oporności. Dlatego zwierzęta hodowlane są często ich źródłem, a tym samym mięso pochodzące od tych zwierząt [5,6].

Zanieczyszczenie żywności lekoopornymi patogenami stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego [7]. Dlatego największe zainteresowanie naukowców skupia się na lekoopornych bakteriach chorobotwórczych [8]. Jednak bakterie niechorobotwórcze mogą tak samo ewoluować w kierunku lekooporności, mogą również wymieniać geny oporności i stanowić ich rezerwuuar w jelitach zwierząt i ludzi. Źródnicowana grupa gatunków utrzymuje dużą zdolność do przenoszenia i mobilizowania genów oporności. Bakterie komensalne i środowiskowe stanowią zatem w dużej mierze ignorowany rezerwuuar genów oporności. Dzięki nim geny te mogą bezpośrednio lub co bardziej prawdopodobnie pośrednio, przedostawać się z czasem do ludzkich patogenów poprzez żywność, wodę itd. [9].

Formą adaptacji drobnoustrojów do niekorzystnych warunków środowiskowych jest zmiana fenotypu. Produkcja enzymów rozkładających antybiotyki jest najpopularniejszym sposobem zmniejszającym skuteczność antybiotyków i prowadzącym do powstania lekooporności [3,4]. Przykładem oporności na antybiotyki występującej u szeroko rozpowszechnionych Gram-ujemnych bakterii, przede wszystkim patogennych *Enterobacteriaceae*, jest produkcja beta-laktamaz (Ryc. 1). Lekooporność typu ESBL, tzn. oporność związana z wytwarzaniem beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym jest jednym z wariantów umożliwiających hydrolizę antybiotyków z grupy beta-laktamowych, w tym cefalosporyn trzeciej generacji i aztreonamu, ale nie karbapenemów [10,11].

dr Sylwia Andrzejczak-Grząd-ko¹✉,

mgr Natalia Buda²,

lic. Antonina Mamczur²,

mgr Sylwia Kamizielak³

¹Katedra Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

²Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

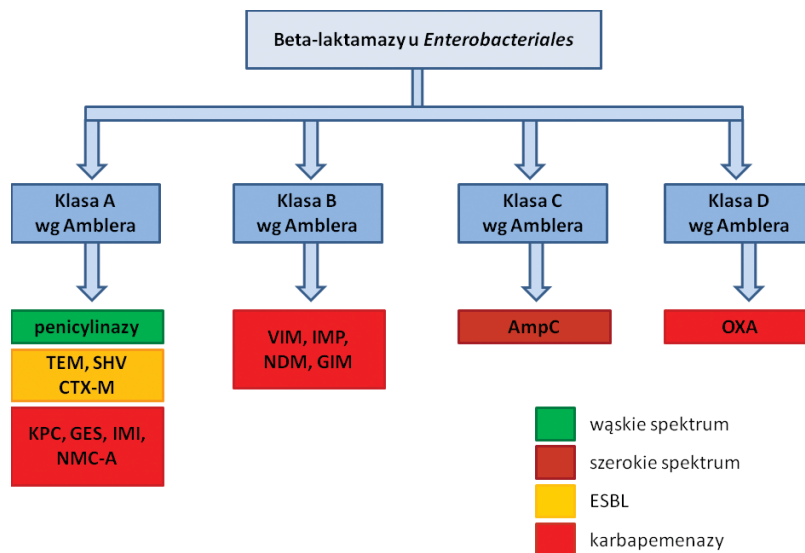
³Nordis Chłodnie Polskie Sp. z o.o., Zielona Góra

https://doi.org/10.18388/pb.2021_484

✉ autor korespondujący: s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, beta-laktamazy, ESBL, *Enterobacteriales*

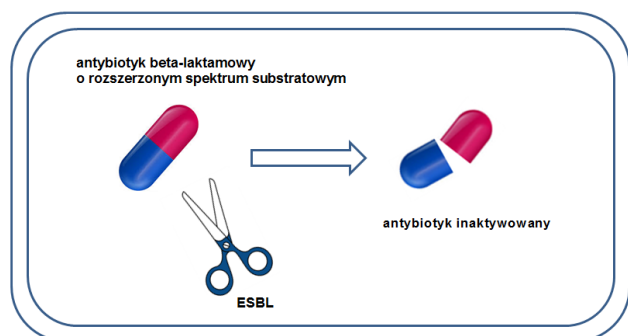
Podziękowania: Projekt współfinansowany z budżetu Urzędu Marszałkowskiego w Zielonej Górze w ramach konkursu „Małe dotacje dla uczelni publicznych z terenu województwa lubuskiego 2021”.



Rycina 1. Typy beta-laktamaz występujące wśród *Enterobacteriales*.

Pierwsze doniesienia na temat izolacji bakterii produkujących ESBL miało miejsce na początku lat 80. XX wieku w Europie [12]. Enzymy te powstały na skutek mutacji punktowych w genach enzymów kodujących beta-laktamazy o wąskim spektrum, między innymi TEM i SHV [13]. Mutacje te powodują wysoką aktywność katalityczną w stosunku do beta-laktamów, ze względu na wysokie powinowactwo z tymi antybiotykami [14]. W związku z tym zmienia się konfiguracja aminokwasów wokół miejsca aktywnego enzymu, co umożliwia im hydrolizę antybiotyków beta-laktamowych o rozszerzonym spektrum działania [13,15] (Ryc. 2). ESBL to enzymy, które z powodu zaszłych mutacji i zmiany kolejności aminokwasów, nie tylko rozszerzyły swoje możliwości katalityczne, ale w niektórych przypadkach nawet zmieniły swój profil substratowy [16].

Beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym dzieli się na grupy o odrębnym pochodzeniu ewolucyjnym i różnej strukturze [13]. Większość beta-laktamaz ESBL można podzielić na trzy grupy: typu TEM, typu SHV i typu CTX-M [10]. *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp. stanowią największą grupę drobnoustrojów produkujących te enzymy. Występują one jednak również u innych gatunków *Enterobacteriales*, ale także innych rodzajów, np. bakterii nie prowadzących procesów fermentacyjnych, tj. *Pseudomonas* spp. [8].

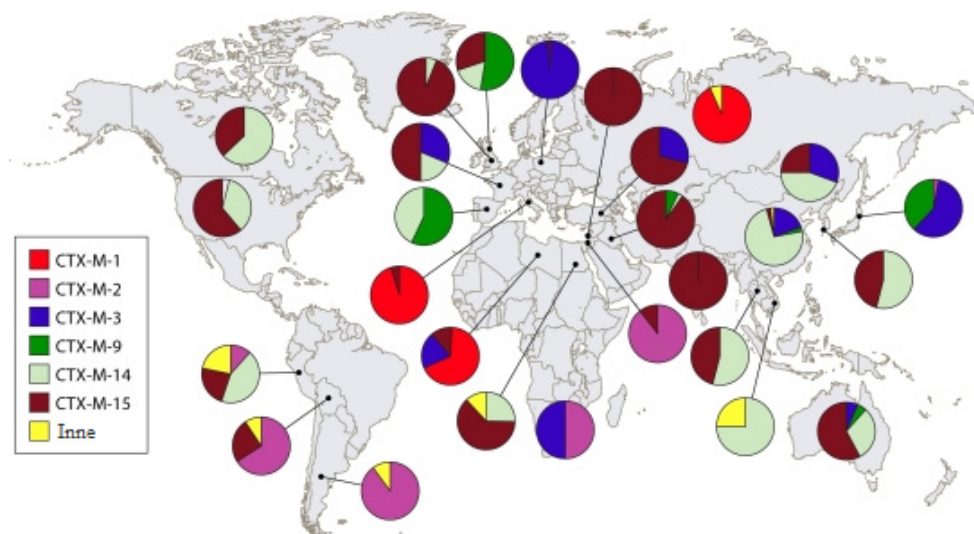


Rycina 2. Działanie beta-laktamaz.

Pierwsze informacje na temat izolacji *E. coli* opornych na cefotaksym (produkujących ESBL typu CTX-M) od zwierząt miało miejsce w 1986 r. w Japonii [17]. W kolejnych latach pojawiały się doniesienia o występowaniu szczepów *E. coli* wytwarzających β -laktamazy typu TEM i SHV nawet u zwierząt udomowionych [18, 19]. Lekooporność ESBL typu CTX-M (ang. *cefotax-imase*) w ciągu ostatnich lat stała się najbardziej rozpowszechnionym typem lekooporności ESBL, obecnym przede wszystkim w krajach Europy Centralnej oraz Ameryki Południowej (Ryc. 3) [10,20,21]. Od początku lat dwutysięcznych enzymy tej grupy tworzą szybko rosnącą rodzinę ESBL, zarówno w warunkach klinicznych, jak i środowiskowych, podczas gdy częstość występowania klasycznych enzymów ESBL, takich jak TEM lub SHV obniża się [22,23].

Geny beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym są zwykle zlokalizowane na plazmidach, które mogą być w łatwy sposób przenoszone zarówno pomiędzy różnymi gatunkami bakterii, jak i wewnątrz tego samego gatunku [24,25]. Beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym są kodowane przez tzw. geny „bla”, które kodują również beta-laktamazy o szerokim spektrum działania [26]. Niektóre z genów ESBL są genami pochodzącymi bezpośrednio od genów innych beta-laktamaz (tak jest w przypadku genów kodujących TEM i SHV, tj. bla_{TEM} oraz bla_{SHV}). Zakażenia drobnoustrojami produkującymi tego typu enzymy zgłaszano głównie w latach 90. i były one bezpośrednio związane z pobytami w szpitalach. Geny z grupy bla_{CTX-M} zaczęły być izolowane w środowisku pozaszpitalnym z bakterii żyjących w przewodzie pokarmowym ludzi, nawet u osób, które nigdy nie były poddane hospitalizacji. Ich pochodzenie nie jest znane, ale przypuszcza się, że wykształcenie się tego rodzaju lekooporności może mieć przyczynę w zbyt częstym użyciu środków przeciwdrobnoustrojowych podczas produkcji żywności [24].

Celem pracy była ocena lekowrażliwości niepatogennych izolatów z rzędu *Enterobacteriales* pozyskanych z mięsa wykorzystywanego w produkcji żywności.



Rycina 3. Występowanie beta-laktamaz z grupy CTX-M [2].

MATERIAŁY I METODY

Sto próbek mięsa wieprzowego (każda o masie 1 g) uzyskano z zakładu produkcji żywności w Zielonej Górze (Polska) od września do października 2021 r. Próbki pobierano z różnych partii surowca, z zachowaniem warunków pracy sterylnej, ograniczających zanieczyszczenia materiału z zewnątrz. Próbki umieszczano w jałowych probówkach, a następnie inkubowano w wodzie peptonowej w temperaturze 37°C przez noc. Izolaty *Enterobacteriales* produkujące ESBL były selekcjonowane na podłożu ChromAgarESBL (Graso-Biotech, Polska). Kolonie o charakterystycznej morfologii identyfikowano do poziomu gatunku metodą MALDI-TOF.

W badaniach wykorzystano 18 izolatów tj. *Serratia fonticola/liquefaciens* (8), *Rahnella institutia* (6), *Hafnia alvei* (3) i *Citrobacter freundii* (1).

Fenotypową ocenę lekooporności typu ESBL prowadzono z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej (Ryc. 4). Do sporządzenia antybiogramów użyto gotowego zestawu MASTDISCCombi (Mast Group, Niemcy). Zestaw ten składa się z czterech krążków nasączonych antybiotykami oraz antybiotykami z inhibitorami enzymów służących do oceny zarówno lekooporności typu ESBL, jak i AmpC. Krążki antybiotykowe użyte do fenotypowej oceny lekooporności typu ESBL zawierały:

- A – CPD10 – cefpodoksym (beta-laktam należący do cefalosporyn III-generacji),
- B – CPD10 (cefpodoksym) + inhibitor ESBL (kwas klawulonowy),
- C – CPD10 (cefpodoksym) + inhibitor AmpC (kwas boronowy),
- D – CPD10 (cefpodoksym) + inhibitor ESBL + inhibitor AmpC.

Jak przedstawiono na Rycinie 4, aby szczep bakteryjny został uznany za ESBL-pozytywny musiał spełnić następujące warunki:

- średnica strefy zahamowania wzrostu dookoła krążka A powinna wynosić mniej niż 21 mm,
- różnica średnic stref zahamowania wzrostu dookoła krążka A oraz krążka B powinna wynosić co najmniej 5 mm,
- różnica średnic stref zahamowania wzrostu dookoła krążka B oraz krążka D, a także krążka A i krążka C powinna być mniejsza niż 4 mm.

Każdy szczep był dodatkowo badany pod kątem wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe metodą dyfuzyjną na agarze Mueller-Hinton zgodnie z zaleceniami EUCAST (<http://www.eucast.org/>). Wykorzystano następujące antybiotyki: ampicylina (AMP), ceftazydym (CAZ), cefatoksym (CTX), imipenem (IPM), meropenem (MEM), aztreonam (ATM), ciprofloksacyna (CIP), amikacyna (AK), gentamycyna (CN), tygecyklina (TGC), chloramfenikol (C), nitrofurantonia (F), sulfametoksazol + trimetoprim (STX).

Izolaty, które w ocenie fenotypowej były ESBL-pozytywne, zostały przeanalizowane pod kątem obecności genów beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym. Do izolacji DNA wykorzystano zestaw Genonic Mini (A&A Biotechnology, Polska). W reakcji PCR wykorzystano gotową, standardową mieszaninę PCR Mix (A&A Biotechnology, Polska), zawierającą w swym składzie polimerazę DNA *Taq* (0,1 U/μl), MgCl₂ (4 mM) oraz dNTPs (0,5 mM każdego z dNTP). Skład reakcji ustalono zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR były następujące:

- CTX-M-F 5-ACCGCCGATAATTCGCAGAT-3 i
- CTX-M-R 5-GATATCGTTGGTGGTGCCATA-3
- SHV-F 5-TCGCCTGTGTATTATCTCCC-3 i
- SHV-R 5-CGCAGATAAATCACCACAATG-3
- TEM-F 5-GAGTATTCAACATTTTCGT-3 i
- TEM-R 5-ACCAATGCTTAATCAGTGA-3

Reakcję PCR prowadzono wg warunków opisanych wcześniej przez Maynard i in. [27] oraz Tabar i in. [28].

Tabela 1. Ocena fenotypowa badanych izolatów.

Szczep	Wzrost na podłożu ChromagarESBL	Metoda krążkowo-dyfuzyjna
NOR 1 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 2 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 3 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 4 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 5 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 6 <i>Hafnia alvei</i>	+	AmpC
NOR 7 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 8 <i>Serratia liquefaciens</i>	+	AmpC
NOR 9 <i>Rahnella inusitata</i>	+	ESBL
NOR 10 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 11 <i>Hafnia alvei</i>	+	AmpC
NOR 12 <i>Hafnia alvei</i>	+	AmpC
NOR 13 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 14 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 15 <i>Citrobacter freundii</i>	+	AmpC
NOR 16 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 17 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL
NOR 18 <i>Serratia fonticola</i>	+	ESBL

ESBL – beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, AmpC – beta-laktamazy AmpC, NOR1 – NOR 18 – nazwy szczepów. Wytluszczone zostały izolaty ESBL – pozytywne

Amplifikowane produkty wizualizowano w elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym, barwionym Midori Green DNA Stain (Genetics, Niemcy).

WYNIKI

Do badań wykorzystano 100 próbek mięsa, z których selektywnie pozyskano 18 izolatów z rzędu *Enterobacteriales*, identyfikowanych do gatunku metodą MALDI-TOF. Wyizolowane szczepy należały do pięciu gatunków i czterech rodzajów. Większość izolatów należała do rodzaju *Serratia* (44%) i *Rahnella* (33%). Bakterii *Hafnia* i *Citrobacter* było mniej – odpowiednio 17 i 5%.

Ocena fenotypowa oporności typu ESBL z wykorzystaniem metody krążkowo-dyfuzyjnej pozwoliła potwierdzić, że 13 z 18 szczepów produkuje beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym i jest to 72% badanych izolatów. Pięć izolatów, pomimo że wzrastały na podłożu chromogennym wykazało jedynie oporność typu AmpC.

Tabela 2. Oporność izolatów *Enterobacteriales*

Szczep	Antybiotyki	Gen bla
NOR 1 <i>Rahnella inusitata</i>	AMP, CAZ, CTX	<i>bla</i> TEM
NOR 2 <i>Rahnella inusitata</i>	AMP, CAZ, CTX, TGC, C, CIP, AK, CN	<i>bla</i> TEM
NOR 3 <i>Rahnella inusitata</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, C, CIP	<i>bla</i> TEM
NOR 4 <i>Rahnella inusitata</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, STX, C, CIP, AK, CN	<i>bla</i> SHV
NOR 5 <i>Rahnella inusitata</i>	AMP, CAZ, CTX, CIP, AK, CN	<i>bla</i> CTX-M
NOR 7 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, IPM	<i>bla</i> CTX-M
NOR 10 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, TGC	<i>bla</i> CTX-M
NOR 11 <i>Hafnia alvei</i>	AMP, CAZ, CTX, CN	<i>bla</i> CTX-M
NOR 13 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, TGC, CN	<i>bla</i> SHV
NOR 14 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM	<i>bla</i> CTX-M
NOR 16 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, AK, CN	<i>bla</i> CTX-M
NOR 17 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, TGC, AK, CN	<i>bla</i> CTX-M
NOR 18 <i>Serratia fonticola</i>	AMP, CAZ, CTX, ATM, TGC, CIP, CN	<i>bla</i> CTX-M

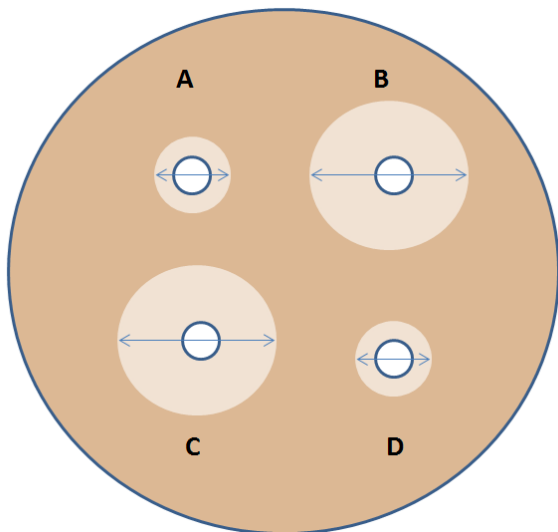
AMP – ampicylina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazydym, CTX – cefotaksym, TGC – tigecyklina, C – chloramfenikol, CIP – ciprofloksacyna, AK – amikacyna, CN – gentamycyna, SXT – sulfametoksazol + trimetoprim, IPM – imipenem.

Wyniki porównania wzrostu na podłożu CHROMagarESBL i metody krążkowo-dyfuzyjnej prezentuje tabela 1.

Wszystkie szczepy ESBL-pozytywne w ocenie fenotypowej zostały poddane ocenie molekularnej pod kątem obecności genów *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} i *bla*_{SHV}. Dla każdego szczepu wykonano także analizę lekooporności na antybiotyki z grup innych niż beta-laktamy. Antybiogramy potwierdziły oporność izolatów na penicyliny i cefalosporyny. Siedem szczepów opornych było także na monobaktamy oraz jeden szczep na karbapenemy. Dodatkowo większość szczepów wykazywała oporność na przynajmniej jeden antybiotyk z innej grupy leków. Wśród analizowanych izolatów jedenaście okazała się być szczepami wielolekoopornymi tj. 4 szczepy odporne były na trzy różne typy antybiotyków, 4 szczepy odporne były na cztery różne typy antybiotyków oraz 1 szczep był odporny na pięć różnych typów antybiotyków. Analizę wyników oznaczania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe prezentuje rycina 5. Zestawienie wyników antybiogramów oraz badań molekularnych przedstawiono w tabeli 2.

DYSKUSJA

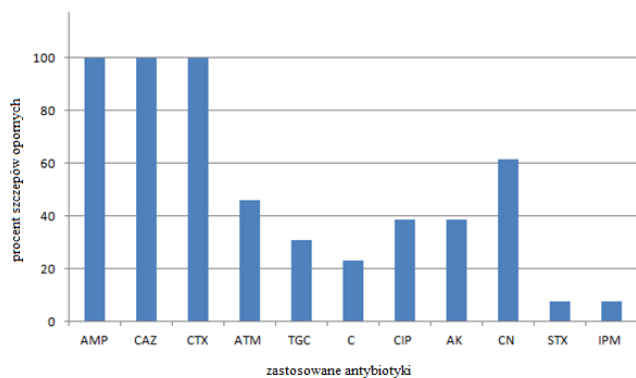
Zwierzęta gospodarskie są integralnym elementem gospodarki światowej jako główne źródło żywności. Aby promować szybki wzrost i przyrost masy ciała, zwierzęta te są rutynowo karmione antybiotykami. Praktyka ta ma na celu



Rycina 4. Kryteria pozytywnej oceny szczepu bakteryjnego pod względem występowania lekooporności typu ESBL (Mast Group, Niemcy).

powstrzymanie chorób u zwierząt żyjących w często zatłoczonych i niehigienicznych warunkach. Niestety, prowadzi to do masowej kumulacji antybiotyków w środowisku i nabywania przez szczepy bakterii odporności na antybiotyki [29]. Wraz z intensywnym stosowaniem środków przeciwbakteryjnych w medycynie weterynaryjnej, poziom oporności na niektóre leki u zwierząt, również tych hodowanych na żywność, gwałtownie wzrósł od czasu, gdy odnotowano pierwsze przypadki oporności na te leki. Wykazano, że z oczyszczalni ścieków z gospodarstw hodowlanych i rzeźni można wyizolować bardziej zróżnicowane pod względem genetycznym lekooporne bakterie w porównaniu ze ściekami szpitalnymi. Bakterie te są idealnym źródłem genów oporności w transferze poziomym [30-32].

W literaturze dostępne są liczne doniesienia na temat izolacji i charakterystyki molekularnej głównie *E. coli* wytwarzających ESBL, których źródłem są zwierzęta hodowane na żywność [33-35]. Odnotowano również znaczny wzrost częstości występowania *E. coli* wytwarzających ESBL w żywności pochodzenia zwierzęcego [10]. Obecność wielolekoopornych szczepów bakteryjnych u zwierząt w Polsce badała Rzewuska i wsp. [36]. Skupiali się oni jednak na



Rycina 5. Antybiotykooporność badanych szczepów wyizolowanych z próbek mięsa (n = 13). AMP - ampicylina, CAZ - ceftazydym, CTX - cefotaksym, TGC - tigecyklina, C - chloramfenikol, CIP - ciprofloksacyna, AK - amikacyna, CN - gentamycyna, SXT - sulfametoksazol+ trimetoprim, IPM - imipenem.

zwierzętach domowych - psach i kotach, które w czasie poboru materiału były chore. W ich badaniach wykazano, że aż 66,8% izolatów pochodzących od chorych zwierząt było wielolekoopornych, a na przestrzeni lat 2007-2013 doszło do statystycznie istotnego wzrostu oporności wśród bakterii izolowanych od zwierząt. Kolejne badania prowadzone również na zwierzętach domowych wykazały, że 3,4% badanych szczepów wytwarzało ESBL [37].

Badaniem próbek mięsa w Polsce zajmowali się Rybak i wsp. [38]. Ich wyniki wskazują na różny poziom szczepów ESBL w zależności od rodzaju badanego mięsa. Najbardziej zanieczyszczone szczepami ESBL było mięso indycze (43%) i wyniki te pokrywały się z wynikami badań prowadzonych w Niemczech (40%) [39]. Biorąc pod uwagę mięso kurcząt, w badaniach Rybak i wsp. [38] prevalencja szczepów ESBL wynosiła 33%, podczas gdy w innych krajach była z reguły wyższa. Na przykład w Bangladeszu i Korei Południowej szczepy te znaleziono aż w 70-74% próbek mięsa pochodzącego od kurcząt [40,41]. Mniejszą, w stosunku do tych pochodzących z Azji, liczbę producentów beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym stwierdzono w Hiszpanii (43%) czy Holandii (24%) [42,43]. W przypadku wieprzowiny w badaniach Rybak i wsp. [38] stwierdzono udział izolatów ESBL na poziomie 24% i był to wynik podobny jak w innych krajach tj. Singapur (27%) i Korea Południowa (30%) [41,44]. W Niemczech natomiast prevalencja szczepów ESBL wynosiła 12% [39].

W badaniach własnych zebrano 100 próbek mięsa. Wyizolowano z nich 13 szczepów *Enterobacteriales* ESBL-pozytywnych. Wśród tych izolatów wykryto zróżnicowaną oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Większość była oporna na wiele leków, w tym gentamycyna (61,5%), aztreonam (46%), amikacyna (38,5%), ciprofloksacyna (38,5%), tigecyklina (31%), chloramfenikol (23%). Wyniki te nie są zgodne z wynikami autorów z różnych krajów [7,10,27,29,34]. Podobieństwo widoczne jest jednak w analizach mięsa pochodzącego z Polski [38].

Dane literaturowe z innych krajów wskazują, że najczęściej izolowanym z mięsa gatunkiem ESBL-pozytywnym jest *E. coli* albo też autorzy koncentrują się na tym gatunku, ze względu na potencjalną patogenność i szerokie rozpowszechnienie w środowisku. Natomiast badania własne, jak również badania Rybak i wsp. [38] pokazują, że najczęściej izolowanymi szczepami wytwarzającymi ESBL są te z rodzaju *Serratia*. W badaniach własnych nie wykazano obecności *E. coli* ESBL, natomiast dominującym gatunkiem lekoopornym była *S. fonticola*. Podobnie w badaniach środowiskowych prowadzonych w północnej Polsce w latach 2019-2021 [45] wykazano, że wśród 40 próbek wody 33 wykazały obecność *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBL. Gatunkiem dominującym wśród tych izolatów była również *S. fonticola* (70%), w porównaniu do *E. coli* (40%).

W badaniach przeprowadzonych w dziewięciu krajach UE (Belgia, Bułgaria, Niemcy, Dania, Hiszpania, Francja, Włochy, Holandia, Polska) w 181 stadach trzody chlewnej zidentyfikowano ponad 400 genów oporności na antybiotyki. Badania te wykazały, że profil oporności prób pobranych z odchodów świń różni się znacznie w zależności od kra-

ju, co ma zapewne związek z polityką stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych w danym państwie – kraje o surowej polityce antybiotykowej, gdzie duży nacisk kładzie się na redukcję antybiotyków w przemyśle spożywczym, mają zwykle niższy wskaźnik oporności na antybiotyki [46]. W toku prowadzonych badań, spośród 13 szczepów ESBL-dodatnich, metodami molekularnymi potwierdzono obecność ośmiu szczepów CTX-M-dodatnich (61,5%), trzech TEM-dodatnich (23%) i dwóch SHV-dodatnich (15,5%). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [47,48] w badaniach własnych również wykazano, że rodzina genów blaCTX-M przeważa i stanowi dominujący fenotyp wśród wszystkich izolatów ESBL-pozytywnych.

PODSUMOWANIE

Proces uboju zwierząt rzeźnych obejmuje etapy, które zwiększają ryzyko skażenia mięsa. Największym ryzykiem zakażenia *Enterobacteriales* podczas obróbki mięsa jest moment patroszenia, który obejmuje usuwanie jelit, zawierających duże ilości bakterii [49,50]. Badania Schill i wsp. [34] wykazały jednak, że świeże mięso wieprzowe może być źródłem ESBL, mimo że standardowe parametry higieny mikrobiologicznej w zakładzie były zadowalające. Zwierzęta, takie jak drób lub świnię, będące nosicielami *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBL, nawet nie wykazujące żadnych klinicznych objawów choroby, są możliwymi rezerwuarami genów ESBL. Geny te mogą być dalej przenoszone na ludzi, w pierwszej kolejności tych pracujących w rzeźni, a dalej przez łańcuch pokarmowy oraz przez niewłaściwą obróbkę mięsa [51,52]. Kontakt mikrobiomu człowieka z bakteriami lekoopornymi może ułatwiać rozprzestrzenianie się genów ESBL [53].

Pomimo faktu, że cefalosporyny są rzadko stosowane w weterynarii, obecność szczepów *Enterobacteriales* ESBL-pozytywnych jest ważnym zagadnieniem wymagającym uwagi. Przy tak zaawansowanym użyciu antybiotyków w hodowli zwierząt i produkcji żywności odzwierzęcej, należy stwierdzić, że nieustanny monitoring wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki jest podstawowym elementem wczesnej diagnostyki i analizy lekooporności. Z jednej strony pozwala to na dysponowanie aktualnymi danymi dotyczącymi wrażliwości szczepów bakteryjnych na określone grupy antybiotyków, co może być przydatne w leczeniu ostrych klinicznych przypadkach chorób. Z drugiej strony badania te stanowią podstawę do racjonalnego stosowania antybiotyków u zwierząt i mogą w ten sposób ograniczać możliwość przenoszenia opornych szczepów drobnoustrojów z żywnością pochodzenia zwierzęcego na człowieka.

PIŚMIENNICTWO

1. Saga T, Yamaguchi K (2009) History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *JMA Journal* 52(2): 103-108
2. Davies J, Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(3): 417-433
3. Maheshwari R (2007) Combating antibiotic resistance in bacteria. *Indian J Microbiol* 47(2): 181-3
4. Wani AK, Akhtar N, Sher F, Navarrete AA, Américo-Pinheiro JHP (2022) Microbial adaptation to different environmental conditions: molecular perspective of evolved genetic and cellular systems. *Arch Microbiol* 204(2): 144

5. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P (2010) Broad-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev* 34(3): 295-316
6. Chattopadhyay MK (2014) Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Front Microbiol* 5:334
7. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(18): 5649-54
8. Bush K, Bradford PA (2020) Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33(2): e00047-19
9. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolfs PF (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7: 173
10. Pitout JDD, Leupland KB (2008) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8: 159-66
11. Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, Lewis JS 2nd, Howard WJ, Johnson LE, Polsky B, Jorgensen JH, Richter SS, Shutt KA, Paterson DL (2013) Community-Associated Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. *Clin Infect Dis* 56(5): 641-8
12. Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 657-86
13. Bajjal T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS (2017) Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med* 7: 12-6
14. Sah SK, Hemalatha S (2014) Extended spectrum Beta lactamase (ESBL) Mechanism of antibiotic resistance and Epidemiology. *Int J Pharm Res* 7: 303-309
15. Gniadkowski M (2008) Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 14(1): 11-32
16. Helfand MS, Bonomo RA (2003) β -Lactamases: A Survey of Protein Diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3: 9-23
17. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y (1988) Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 32(8): 1243-6
18. Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di Matteo P, Battisti A (2005) Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 833-5
19. Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F, Glupczynski Y; ComPath Study Group (2015) Characterization of ESBL- and AmpC-Producing *Enterobacteriaceae* from Diseased Companion Animals in Europe. *Microb Drug Resist* 21(6): 643-50
20. Guenther S, Ewers C, Wieler LH (2011) Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* 2(246): 1-13
21. Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, Saralaya V (2014) Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates from extra-intestinal infections. *J Infect Public Health* 8: 248-253
22. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59: 165-174
23. Irrgang A, Hammerl JA, Falgenhauer L, Guiral E, Schmogger S, Imirzalioglu C, Fischer J, Guerra B, Chakraborty T, Käsbohrer A (2018) Diversity of CTX-M-1-producing *E. coli* from German food samples and genetic diversity of the bla_{CTX-M-1} region on IncI1 ST3 plasmids. *Vet Microbiol* 221: 98-104
24. Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J (2014) Extended-spectrum β -lactamase

- producing *Klebsiella* spp. in chicken meat and humans: a comparison of typing methods. *Clin Microbiol Infect* 20(3): 251-5
25. Ahmed OB, El Hassan MM, Asghar A (2013) Prevalence of TEM, SHV and CTX-M genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Urinary Isolates from Sudan with confirmed ESBL phenotype. *Life Sci J* 10(2): 191-195
 26. Bello-López JM, Rojo-Medina J (2016) Detection of antibiotic resistance genes β -lactamase in bacterial strains isolated from Umbilical Cord Blood Units for transplant. *Rev Med Hosp Gen Méx* 80(1): 31-36
 27. Maynard C, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J (2004) Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* 42(12): 5444-52
 28. Tabar MM, Mirkalantari S, Amoli RI (2016) Detection of ctx-M gene in ESBL-producing *E. coli* strains isolated from urinary tract infection in Semnan, Iran. *Electron Physician* 8(7): 2686-90
 29. Allen HK (2014) Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Curr Opin Microbiol* 19: 25-29
 30. Schijven JF, Blaak H, Schets FM, de Roda Husman AM (2015) Fate of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Faecal Sources in Surface Water and Probability of Human Exposure through Swimming. *Environ Sci Technol* 49(19): 11825-33
 31. Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J (2020) Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 727: 138788
 32. Yuan W, Tian T, Yang Q, Riaz L (2020) Transfer potentials of antibiotic resistance genes in *Escherichia* spp. strains from different sources. *Chemosphere* 246: 125736
 33. Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SA, Hendriksen RS, Hald T, Wegener HC (2011) Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. *Foodborne Pathog Dis* 8(12): 1295-301
 34. Schill F, Abdulmawjood A, Klein G, Reich F (2017) Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in fresh pork meat at processing level in Germany. *Int J Food Microbiol* 257: 58-66
 35. Peirano G, Pitout JDD (2019) Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* 79(14): 1529-1541
 36. Rzewuska M, Czopowicz M, Kizerwetter-Świda M, Chrobak D, Błaszczak B, Binek M (2015) Multidrug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from infections in dogs and cats in Poland (2007-2013). *Sci World J* 2015: 408205
 37. Rzewuska M, Stefańska I, Kizerwetter-Swida M, Chrobak-Cmiel D, Szczygielska P, Leśniak M, Binek M (2015) Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamases Produced by *Escherichia coli* Strains Isolated from Dogs in Poland. *Pol J Microbiol* 64(3): 285-8
 38. Rybak B, Potrykus M, Plenis A, Wolska L (2022) Raw Meat Contaminated with Cephalosporin-Resistant *Enterobacteriales* as a Potential Source of Human Home Exposure to Multidrug-Resistant Bacteria. *Molecules* 27(13): 4151
 39. Kaesbohrer A, Bakran-Lebl K, Irrgang A, Fischer J, Kämpf P, Schifmann A, Werckenthin C, Busch M, Kreienbrock L, Hille K (2019) Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. *Vet Microbiol* 233: 52-60
 40. Parvin MS, Talukder S, Ali MY, Chowdhury EH, Rahman MT, Islam MT (2020) Antimicrobial Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Frozen Chicken Meat in Bangladesh. *Pathogens* 9(6): 420
 41. Kim YJ, Moon JS, Oh DH, Chon JW, Song BR, Lim JS, Heo EJ, Park HJ, Wee SH, Sung K (2018) Genotypic characterization of ESBL-producing *E. coli* from imported meat in South Korea. *Food Res Int* 107: 158-164
 42. Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano Mde L (2013) Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 2013 93(2): 316-21
 43. Huizinga P, Kluytmans-van den Bergh M, Rossen JW, Willemsen I, Verhulst C, Savelkoul PHM, Friedrich AW, García-Cobos S, Kluytmans J (2019) Decreasing prevalence of contamination with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) in retail chicken meat in the Netherlands. *PLoS One* 14(12): e0226828
 44. Guo S, Aung KT, Leekitcharoenphon P, Tay MYF, Seow KLG, Zhong Y, Ng LC, Aarestrup FM, Schlundt J (2021) Prevalence and genomic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail raw meats in Singapore. *J Antimicrob Chemother* 76(3): 601-605
 45. Rybak B, Wawrzyniak N, Wolska L, Potrykus M (2021) *Escherichia coli* and *Serratia fonticola* ESBLs as a potential source of antibiotics resistance dissemination in the Tricity water reservoirs. *Acta Biochim Pol* 68(3): 437-448
 46. Zalewska M, Błażejewska A, Czapko A, Popowska M (2021) Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure - Consequences of Its Application in Agriculture. *Front Microbiol* 12: 610656
 47. Liu JH, Wei SY, Ma JY, Zeng ZL, Lu DH, Yang GX, Chen ZL (2007) Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 β -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *Int J Antimicrob Agents* 29: 576-581
 48. Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z, Liu JH (2012) Prevalence and characterisation of CTX-M- β lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in China. *Int J Antimicrob Agents* 39: 305-310
 49. Warriner K, Aldsworth TG, Kaur S, Dodd CE (2002) Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. *J Appl Microbiol* 93(1): 169-77.
 50. Oniciuc EA, Likotrafiti E, Alvarez-Molina A, Prieto M, López M, Alvarez-Ordóñez A (2019) Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. *Curr Opin Food Sci* 30: 21-26
 51. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJ, Fluit AC, Bonten MJ, Willems RJ, de la Cruz F, van Schaik W (2014) Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet* 10(12): e1004776
 52. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, Meilaender A, Montabauer G, Fimmers R, Parcina M, Hoerauf A, Exner M, Petersen B, Bierbaum G, Bekeredjian-Ding I (2015) Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel. *PLoS One* 10(9): e0138173
 53. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Heinemann C, Bierbaum G, Exner M, Petersen B, Steinhoff-Wagner J (2018) Reservoirs and transmission pathways of resistant indicator bacteria in the Biotope pig stable and along the food chain: A review from a One Health Perspective. *Sustainability* 10: 3967

Characteristic of extended substrate-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriales* isolated from pork meat

Sylwia Andrzejczak-Grządko^{1✉}, Natalia Buda², Antonina Mamczur², Sylwia Kamizielak³

¹Department of Biotechnology, Institute of Biological Science, University of Zielona Góra

²Faculty of Biological Science, University of Zielona Góra

³Nordis Chłodnie Polskie Sp. z o.o., Zielona Góra

✉Corresponding author: s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl

Keywords: antibiotic resistance, beta-lactamases, ESBL, *Enterobacteriales*

ABSTRACT

Antibiotic resistance among bacteria is an ever-growing problem in both human and veterinary medicine. Livestock and meat from their slaughter are often sources of drug-resistant bacteria. The ability to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) is common among *Enterobacteriales*, including commensal bacteria. These bacteria represent a largely ignored reservoir of ESBL genes. The aim of this study was to assess the drug susceptibility of non-pathogenic *Enterobacteriales* isolates obtained from meat used in food production. Eighteen *Enterobacteriales* strains were selectively isolated on chromogenic medium from the 100 meat samples. The isolates identified to species were analysed for antibiotic resistance using phenotypic methods (the disc-diffusion method) and molecular methods to identify *bla* genes (using the PCR technique). Among the strains tested, ESBL-type resistance was demonstrated – 13 of 18 (72%) isolates tested were found to be ESBL-producing strains. Of these, eight possessed the CTX-M gene, three the TEM gene and one the SHV gene.

