

Oporność mikrobiologiczna na antybiotyki szczepów *Escherichia coli* izolowanych od świń w latach 2009–2010

Dariusz Wasyl, Andrzej Hoszowski

z Zakładu Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Powszechne stosowanie antybiotyków w leczeniu bakteryjnych zakażeń ludzi i zwierząt spowodowało wzrost częstości występowania szczepów opornych. W przypadku bakterii patogennych może to prowadzić do niepowodzeń terapeutycznych bezpośrednio zagrażających zdrowiu lub życiu. Z kolei bakterie wskaźnikowe

– izolowane od klinicznie zdrowych zwierząt – są rezerwuarem genów oporności, a monitorowanie poziomu występowania tego zjawiska pozwala identyfikować potencjalne zagrożenia zdrowia ludzi i zwierząt, które wynikają z pojawiania się i występowania określonych mechanizmów oporności. Dzięki temu możliwe jest

podejmowanie działań zapobiegających ich rozprzestrzenianiu. Ponadto monitorowanie oporności bakterii wskaźnikowych dostarcza informacji odnośnie do skali stosowania antybiotyków u zwierząt.

Celem rekomendowanego przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zharmonizowanego systemu monitorowania oporności *E. coli*, jest zbieranie dokładnych i porównywalnych danych z wszystkich krajów członkowskich UE (1, 2). Świnie, ze względu na wielkość produkcji i udział mięsa wieprzowego w diecie człowieka, są jednym z gatunków zwierząt objętych programem monitorowania oporności. W celu zachowania odpowiedniej czułości monitoringu i spełnienia zasady losowego pobierania próbek w każdym z krajów członkowskich przewidziano do zbadania w ciągu roku 170 szczepów *E. coli* izolowanych z kału pobieranego od świń w trakcie uboju. Określono również metodę izolacji i identyfikacji *E. coli*, oznaczania

oporności oraz sposób przekazywania wyników do EFSA (1).

Prezentowane wyniki badań pochodzą z dwuletniego okresu realizacji monitoringu prowadzonego zgodnie z wcześniej opisanymi zasadami. Celem pracy była ocena częstości i trendów w występowaniu oporności na antybiotyki wśród szczepów *E. coli*, izolowanych od klinicznie zdrowych świń w latach 2009–2010.

Materiały i metody

Urzędowi lekarze weterynarii pobierali próbki w wyznaczonych na terenie całego kraju rzeźniach, w których, w roku poprzedzającym pobieranie próbek, ubojowi poddano 70% pogłowia świń (tab. 1). Do walidacji losowości pobierania próbek wykorzystano współczynnik różnorodności Simpsona $-D$ (3) wyliczany dla następujących zmiennych: numery identyfikacyjne gospodarstw, z których pochodziły zwierzęta, lokalizacja geograficzna tych gospodarstw (do poziomu powiatu) oraz data pobrania próbek (tab. 2). Na ryc. 1 zobrazowano lokalizację geograficzną gospodarstw, z których pochodziły zwierzęta.

Badaniom poddawano po 3 wymazy z odbytu pobierane od 3 kolejnych zwierząt z linii ubojowej. Wymazy umieszczano w podłożu transportowym i przesyłano w temperaturze otoczenia do laboratorium pocztą kurierską, gdzie wykonywano bezpośrednie posiewy wymazów na agar MacConkeya. Z uzyskanych hodowli wybierano jedną kolonię o typowej dla *E. coli* morfologii, którą poddawano weryfikacji biochemicznej, a następnie oznaczano oporność na antybiotyki metodą mikrozdzieńczeń w bulionie (Sensititre®, TREK D.S.). Wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) trzynastu badanych antybiotyków interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), dzieląc badaną populację bakterii na grupę szczepów dzikich – WT (wild-type) oraz NWT (non-wild type). Według tych kryteriów, zaliczenie szczepu do kategorii NWT jest równoznaczne ze stwierdzeniem oporności, która wynika z prawdopodobnej obecności nabytego mechanizmu oporności na dany antybiotyk.

Wyniki

Analiza danych dotyczących próbek wskazuje, że były one pobierane losowo z całej populacji zwierząt, z uwzględnieniem zasady losowości, obejmującej lokalizację gospodarstw i sezonowość. O zachowaniu losowości pobierania próbek świadczą zbliżone do jedności wartości współczynnika różnorodności D wyznaczone dla poszczególnych zmiennych (tab. 2) oraz ukazana na

ryc. 1 lokalizacja geograficzna gospodarstw, z których pochodziły badane zwierzęta.

W tabeli 3 przedstawiono antybiotyki użyte w badaniach, kryteria interpretacji oraz częstość występowania oporności na nie wśród szczepów *E. coli* izolowanych w latach 2009–2010. W tym okresie stwierdzano oporność na każdy z zastosowanych antybiotyków. Najwyższy odsetek szczepów opornych (około 40%) odnotowano w przypadku streptomycyny i tetracykliny. Oporność na cefalosporyny obserwowano rzadko (około 1%), natomiast w odniesieniu do chinolonów, od 5,3 do 13,5% szczepów wykazywało wartość MIC, świadcząca o obecności nabytego mechanizmu oporności na te substancje. Różnice w poziomach oporności na poszczególne substancje stwierdzane w 2010 r. w porównaniu z 2009 r. nie były istotne statystycznie (ryc. 2), chociaż odnotowano wyższy odsetek szczepów opornych na cefalosporyny, streptomycynę i fenikole. Największy spadek w częstości występowania oporności odnotowano w przypadku ampicyliny (7,5%) oraz cyprofloksacyny (5,8%).

Odsetek szczepów dzikich, tj. nieposiadających mechanizmów oporności na żadną z analizowanych substancji antybakteryjnych, wzrósł z 34,3% w 2009 r. do 44,7% w 2010 r. ($p \leq 0,05$; ryc. 3). Wśród szczepów wykazujących oporność odnotowano w obu tych latach wystąpienie, odpowiednio, 55 i 45 różnych profili oporności, z których najbardziej rozbudowany obejmował 11 substancji z 7 klas antybiotyków (AmpNalCipChlFlrTcyStrGenKanSmxTmp) – dane nieprezentowane. Zmiany w częstości występowania profili obejmujących od 1 do 7 klas antybiotyków nie były statystycznie istotne, aczkolwiek zaobserwowano spadek w liczbie profili obejmujących 2 klasy do poziomu 6,1% i wzrost

Microbiological resistance to antibiotics in *Escherichia coli* strains isolated from pigs in the years 2009–2010

Wasył D., Hoszowski A., Department of Microbiology, National Veterinary Research Institute, Puławy

The purpose of this paper was to present results of harmonized antimicrobial resistance monitoring of indicator *Escherichia coli* strains isolated from healthy pigs slaughtered in 2009 and 2010. Thirteen antimicrobials were used to perform the study. Sensitivity tests showed resistance of *E. coli* strains to all used antimicrobials. As much as 40% of tested bacteria were resistant to streptomycin and tetracycline, whereas resistance to cephalosporin was infrequent and less than 10% of strains were not sensitive to quinolones. Numerous resistance profiles comprised up to 11 compounds from 7 antimicrobial classes. Year-to-year trends in *E. coli* pig isolates resistance were not significant, but it has been also observed that strains without established mechanisms of antimicrobial resistance increased in number ($P \leq 0,05$). It is known that resistance of these bacteria is correlated with the high consumption of drugs, used for the antimicrobial treatment of pigs. Results of our study justify the need for the continuous monitoring of antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from animals. It should be followed by complex studies on the microbial drug resistance genetic background. This can lead to the prudent and targeted use of antimicrobials in animals. Considerable attention should be also paid to the public health, including possible therapeutic failures with the use of drugs critically important for human medicine.

Keywords: antimicrobial resistance, *E. coli*, pigs, antibacterial treatment.

liczby szczepów z profilami oporności na 3 klasy o 6,5%.

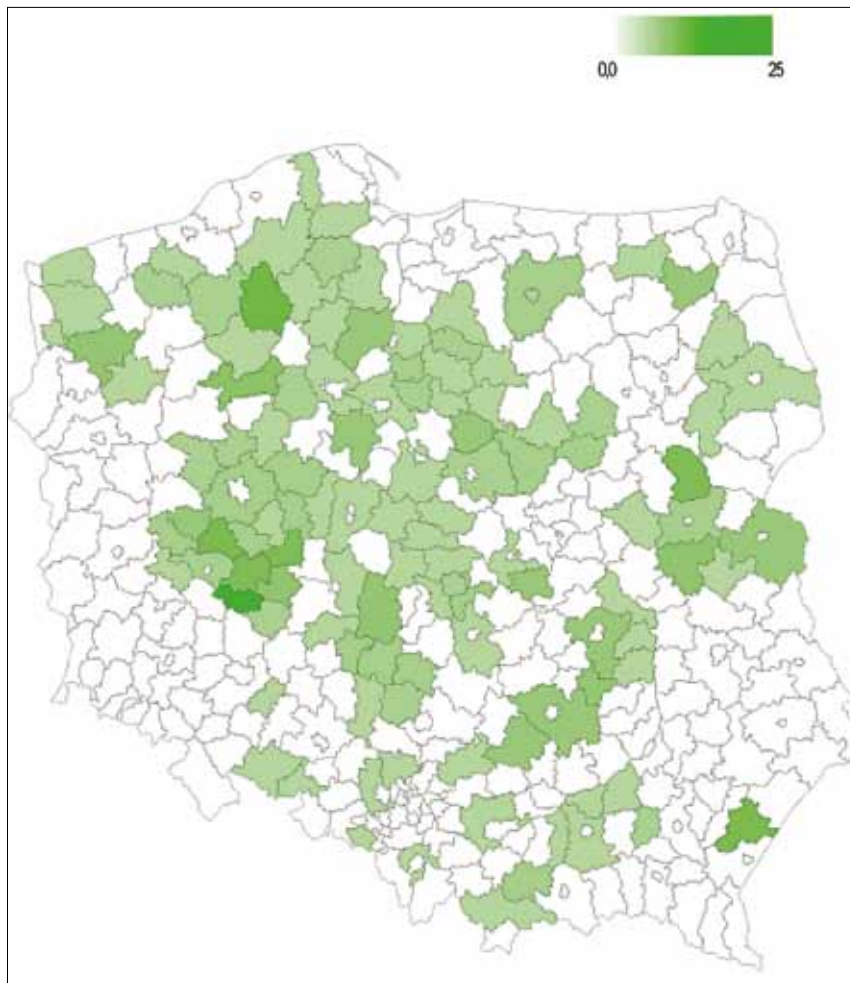
Tabela 1. Dane dotyczące wielkości uboju świń

| | 2009 r. | 2010 r. |
|--|------------|------------|
| Liczba ubitych sztuk wg danych Inspekcji Weterynaryjnej | 17 420 288 | 19 488 804 |
| Liczba rzeźni prowadzących ubój wg Inspekcji Weterynaryjnej | 706 | 694 |
| Liczba (%) rzeźni wyznaczonych do pobierania próbek | 109 (15%) | 94 (14%) |
| Udział wytypowanych rzeźni w całkowitym, rocznym uboju w skali kraju | 70% | 70% |

Tabela 2. Losowość pobierania próbek

| | 2009 r. | 2010 r. |
|---|--------------|-------------|
| Liczba pobranych próbek | 181 | 175 |
| Liczba gospodarstw, z których pochodziły zwierzęta (D) | 108 (0,988)* | 92 (0,985)* |
| Liczba powiatów – lokalizacja geograficzna gospodarstw (D) | 70 (0,974)* | 90 (0,993)* |
| Liczba dni, w których pobierano próbki (D) | 65 (0,980)* | 92 (0,990)* |
| Liczba szczepów badanych (odsetek izolacji <i>E. coli</i>) | 178 (98,3%) | 170 (97,1%) |

* informacje nie były dostępne dla wszystkich badanych próbek



Ryc. 1. Lokalizacja geograficzna gospodarstw, z których pochodziły zwierzęta objęte badaniem (informacja dostępna w przypadku 88,2% badanych próbek)

Tabela 3. Oporność na antybiotyki szczepów *E. coli*

| Substancja czynna | NWT > mg/l | Oporność mikrobiologiczna | | | |
|------------------------|------------|---------------------------|------|-----------------|------|
| | | 2009 r. (n=178) | | 2010 r. (n=170) | |
| | | n | % | n | % |
| Ampicylina (AMP) | 8 | 49 | 27,5 | 34 | 20,0 |
| Ceftazydim (CAZ) | 0,25 | 2 | 1,1 | 2 | 1,2 |
| Cefotaksym (CTX) | 0,5 | 1 | 0,6 | 2 | 1,2 |
| Gentamycyna (GEN) | 2 | 6 | 3,4 | 4 | 2,4 |
| Kanamycyna (KAN) | 8 | 9 | 5,1 | 8 | 4,7 |
| Streptomycyna (STR) | 16 | 71 | 39,9 | 72 | 42,4 |
| Kwas nalidyksowy (NAL) | 16 | 18 | 10,1 | 9 | 5,3 |
| Cyprofloksacyna (CIP) | 0,032 | 24 | 13,5 | 13 | 7,6 |
| Sulfametoksazol (SMX) | 256* | 60 | 33,7 | 52 | 30,6 |
| Trimetoprim (TMP) | 2 | 34 | 19,1 | 24 | 14,1 |
| Chloramfenikol (CHL) | 16 | 11 | 6,2 | 15 | 8,8 |
| Florfenikol (FLR) | 16 | 2 | 1,1 | 6 | 3,5 |
| Tetracyklina (TCY) | 8 | 74 | 41,6 | 66 | 38,8 |

* kryterium tymczasowe rekomendowane przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej, Danish Technical University, Lyngby, Dania

Objaśnienie: NWT (non-wild type) – szczepy posiadające nabyte drogą transferu lub mutacji mechanizmy oporności na dany lek

Omówienie wyników

Zwierzęta są głównym rezerwuarem bakterii opornych na antybiotyki, które mogą wpływać na zdrowie ludzi. W procesie rozprzestrzeniania się oporności wśród bakterii szczególne znaczenie mają te, będące przyczyną zoonoz. Jednakże, oprócz patogenów, również oporne odzwierzęce drobnoustroje komensaliczne, jak np. *E. coli*, mogą przyczynić się do przeniesienia różnych mechanizmów oporności na bakterie bytujące u ludzi (4, 5). Prezentowane badania są jednym z pierwszych doniesień uzyskanych w ramach wdrożenia zharmonizowanego systemu monitorowania oporności, przygotowanego przez EFSA (1).

Z uzyskanych danych wynika, że najczęściej wśród badanych szczepów *E. coli* stwierdzano oporność na tetracyklinę, streptomycynę, sulfametoksazol i ampicylinę. Substancje te reprezentują klasy antybiotyków stosowane w największych ilościach (83,7%) w leczeniu świń w Polsce w 2010 r. (6). Obserwacja ta dowodzi korelacji częstości występowania szczepów opornych i preferencji w stosowaniu antybiotyków, które wywierają presję selekcyjną nie tylko na bakterie, będące przyczyną zakażeń u zwierząt, ale i te, będące elementem flory fizjologicznej (7, 8). Stwierdzony poziom oporności szczepów *E. coli* był zbliżony do obserwacji innych autorów, którzy wskazują również na istnienie powiązań pomiędzy opornością *E. coli* izolowanych od zwierząt i ludzi oraz z próbek środowiskowych (4, 8). Mechanizmy nabywania oporności mogą się jednak istotnie różnić w zależności od miejsca pochodzenia izolatów (9). Wskazuje to na fakt, że nabywanie oporności przez bakterie i przekazywanie na inne drobnoustroje ma charakter wieloczynnikowy.

Oprócz wysokiego poziomu oporności badanych szczepów *E. coli* na substancje powszechnie stosowane w produkcji trzody chlewnej, uzyskane wyniki zwracają uwagę na zmniejszenie się odsetka izolatów z mikrobiologiczną opornością na antybiotyki istotne w medycynie, takie jak cefalosporyny i fluorochinolony (10). Wyniki z badań wykonanych wcześniej wykazały, że świnie są często skolonizowane przez *E. coli* oporne na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum (ESC – extended spectrum cephalosporinases), głównie na skutek wytwarzania betalaktamazy CTX-M-1 i cefalosporynazy CMY-2 (9, 11). Mechanizmy te są jednak rzadko spotykane w zakażeniach ludzi w Polsce (12). Można więc sądzić, że w procesie przekazywania genów oporności do bakterii występujących u ludzi oprócz zwierząt mają swój udział inne czynniki, a epidemiologia tego zjawiska ma złożony charakter. Odnotowany wyższy odsetek szczepów opornych

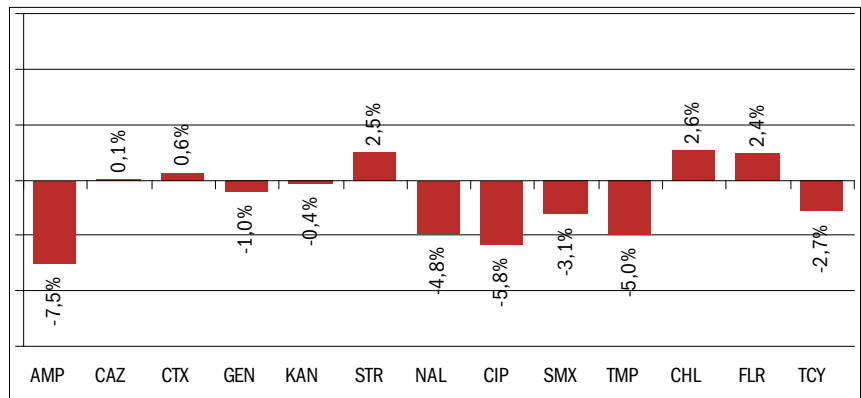
na cyprofloksacynę niż na kwas nalidyksowy wskazuje na obecność u badanych *E. coli* szczepów posiadających mechanizmy oporności zlokalizowane na plazmidach (PMQR – plasmid mediated quinolone resistance; 13). W badaniach prowadzonych we współpracy z laboratoriami referencyjnymi kilkunastu krajów europejskich wykazano, że szczepy te posiadały geny oporności *qnrS1* i *qnrB15* (14). Wykrycie mechanizmów oporności typu PMQR, jak i ESC wśród szczepów *E. coli*, w tym i u tych izolowanych w Polsce, wskazuje na ryzyko rozprzestrzeniania się genów oporności na drodze horyzontalnej, a więc pomiędzy różnymi rodzajami i gatunkami bakterii. Stanowi to bez wątpienia zagrożenie dla zdrowia publicznego, gdyż zarówno chinolony, jak i cefalosporyny są traktowane w medycynie jako leki z wyboru przy ratowaniu życia w przypadku systemowych zakażeń bakteryjnych (4, 5, 7).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że, dzięki wdrożeniu zharmonizowanego i ogólnokrajowego systemu monitorowania, uzyskano wiarygodne dane epidemiologiczne w zakresie występowania i tendencji w oporności wskaźnikowych *E. coli* izolowanych od świń rzeźnych na substancje reprezentujące klasy antybiotyków najczęściej stosowane w terapii ludzi i zwierząt. Odnotowano zależność pomiędzy preferencjami w stosowaniu antybiotyków u świń i częstością występowania oporności na te substancje. Chociaż w 2010 r., w porównaniu do roku poprzedniego, odnotowano wzrost liczby wrażliwych szczepów na oceaniane antybiotyki, to różnice nie były statystycznie istotne. Wahania poziomu oporności *E. coli*, liczba i złożoność stwierdzonych profili oporności uzasadniają potrzebę prowadzenia stałego monitoringu, któremu towarzyszy identyfikacja mechanizmów oporności za pomocą metod biologii molekularnej. Ich znajomość ma szczególnie znaczenie w kontekście ograniczania zagrożeń dla zdrowia człowieka związanych z narastaniem oporności na antybiotyki wśród bakterii odzwierzęcych i występowania pozostałości w tkankach zwierząt. Mamy nadzieję, że przedstawione wyniki mogą przyczynić się do optymalizacji stosowania antybiotyków w hodowli świń, a poprzez to zmniejszona zostanie presja selekcyjna związana ze stosowaniem tych preparatów.

Podziękowania

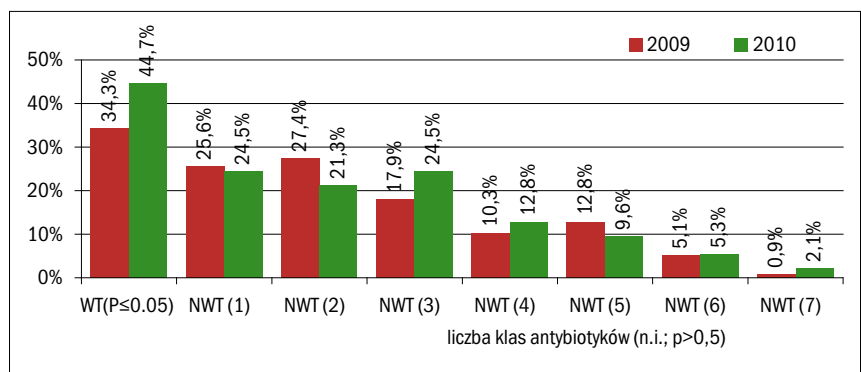
Autorzy dziękują pracownikom Wojewódzkiego i Powiatowych Inspektoratów Weterynarii za udział w pobieraniu próbek oraz współpracownikom z Zakładu Mikrobiologii za realizację badań laboratoryjnych.

Badania zostały wykonane w ramach zadania 12 Programu Wieloletniego na lata 2009–2013 „Ochrona zdrowia



Ryc. 2. Tendencje zmian w oporności na antybiotyki w latach 2009–2010 (n.i.; $p > 0.05$)

Objaśnienia: AMP – ampicylina, CAZ – ceftazydim, CTX – cefotaksym, GEN – gentamycyna, KAN – kanamycyna, STR – streptomycyna, NAL – kwas nalidyksowy, CIP – cyprofloksacyna, SMX – sulfametaksazol, TMP – trimetoprim, CHL – chloramfenikol, FLR – florfenikol, TCY – tetracyklina



Ryc. 3. Tendencje w występowaniu profili oporności. Objasnienia: AMP – ampicylina, CAZ – ceftazydim, CTX – cefotaksym, GEN – gentamycyna, KAN – kanamycyna, STR – streptomycyna, NAL – kwas nalidyksowy, CIP – cyprofloksacyna, SMX – sulfametaksazol, TMP – trimetoprim, CHL – chloramfenikol, FLR – florfenikol, TCY – tetracyklina

zwierząt i zdrowia publicznego” (uchwała nr 244/2008 Rady Ministrów z dnia 28 października 2008).

Piśmiennictwo

1. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA Journal* 2008, **141**, 1–44.
2. European Food Safety Authority Working Group on Developing Harmonised Schemes for Monitoring Antimicrobial Resistance in Zoonotic Agents: Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, **14**, 522–533.
3. Hunter P. R., Gaston M. A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988, **26**, 2465–2466.
4. Moodley A., Guardabassi L.: Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53**, 1709–1711.
5. Hammerum A. M., Heuer O. E.: Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **48**, 916–921.
6. Krasucka D., Cybulski W., Klimowicz A.: Analiza stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych u świń w Polsce w 2010 roku. *Magazyn Wet.* 2011, **20**, 280–282.
7. Cavaco L. M., Abatih E., Aarestrup F. M., Guardabassi L.: Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**, 3612–3616.
8. Kozak G. K., Boerlin P., Janek N., Reid-Smith R. J., Jardine C.: Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates

- from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, **75**, 559–566.
9. Wasyl D., Hasman H., Cavaco L. M., Aarestrup F. M.: Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic *Escherichia coli* from food-producing animals slaughtered in Poland. *Microb. Drug Resist.* 2011, doi: 10.1089/mdr.2011.0033.
10. Collignon P., Powers J. H., Chiller T. M., Aidara-Kane A., Aarestrup F. M.: World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **49**, 132–141.
11. Wasyl D., Hozowski A., Zajac M., Skarżyńska M.: Simple and efficient screening method for detection of cephalosporin resistant *Escherichia coli*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, **54**, 147–151.
12. Empel J., Baraniak A., Literacka E., Mrówka A., Fiett J., Sadowy E., Hryniewicz W., Gniadkowski M.: Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, **52**, 2449–2454.
13. Wasyl D.: Mechanizmy oporności *Salmonella* na chinolony. *Medycyna Wet.* 2009, **65**, 516–520.
14. Veldman K., Cavaco L. M., Mevius D., Battisti A., Franco A., Botteldoorn N., Bruneau M., Perrin-Guyomard A., Cerny T., De Frutos Escobar C., Guerra B., Schroeter A., Guetierrez M., Hopkins K., Myllyniemi A. L., Sunde M., Wasyl D., Aarestrup F. M.: International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, **66**, 1278–1286.

Dr Dariusz Wasyl, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 21-100 Puławy