

Elżbieta Maćkiw<sup>1</sup>, Katarzyna Rzewuska<sup>1</sup>, Katarzyna Tomczuk<sup>1</sup>,  
Dorota Korsak<sup>1,2</sup>

## OPORNOŚĆ NA CIPROFLOKSACYNĘ I TETRACYKLINĘ SZCZEPÓW *CAMPYLOBACTER* SPP. IZOLOWANYCH Z PRODUKTÓW DROBIARSKICH

<sup>1</sup> Pracownia Mikrobiologii Zakładu Bezpieczeństwa Żywności  
Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie  
Kierownik: dr K. Stoś

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii Stosowanej  
Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
Kierownik: prof. dr hab. J. Bielecki

*W latach 2008–2009 przeprowadzono badania, których celem było określenie wrażliwości szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych z próbek żywności pochodzenia zwierzęcego na fluorochinolony (ciprofloksacynę) i tetracykliny (tetracyklinę).*

*Przebadano łącznie 134 próbki mięsa drobiowego pochodzącego z handlu detalicznego. W 110 próbkach stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Campylobacter*, co stanowiło 82,1% wszystkich przebadanych próbek. Najczęściej izolowanym gatunkiem był *C. coli* – jego obecność stwierdzano w 84 próbach (76%). Natomiast z 26 prób (24%) wyizolowano *C. jejuni*.*

*Uzyskane wyniki wskazują na bardzo wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* spp. opornych na ciprofloksacynę i tetracyklinę. Oporność na ciprofloksacynę szczepów *C. jejuni* wynosiła 100%, a *C. coli* 98,8%. Natomiast 65,5% szczepów *C. coli* było opornych na tetracyklinę, a *C. jejuni* 80,8%.*

Hasła kluczowe: mięso drobiowe, *Campylobacter* spp., ciprofloksacyna, tetracyklina.  
Key words: raw chicken meat, *Campylobacter* spp., ciprofloxacin, tetracyclin.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost oporności bakterii *Campylobacter* spp. izolowanych od ludzi i zwierząt oraz z żywności, na znane i powszechnie stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki. Utrudnia to znacznie leczenie wielu chorób, w tym również kamylobakteriozy, wydłużając czas terapii lub powodując całkowitą jej nieskuteczność (1, 2). W krajach uprzemysłowionych wzrost oporności na antybiotyki stosowane w terapii ludzkich infekcji pałeczkami *Campylobacter* kształtuje się na poziomie około 1–2% w skali rocznej, w jeszcze większym stopniu dotyczy to krajów rozwijających się (3).

Badania epidemiologiczne wskazują na dwie główne przyczyny narastania oporności na stosowane terapie wśród szczepów *Campylobacter*. Jedną z nich jest często niewłaściwe stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków w terapii chorób ludzkich, często w infekcjach przebiegających z tendencją do samowyleczenia.

Drugą bardzo istotną przyczyną jest nadużywanie tych substancji w leczeniu zwierząt oraz w hodowli. Stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków u drobiu, który jest głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* spp. może prowadzić do selekcji opornych szczepów, a następnie do ich transmisji na ludzi poprzez zakażoną żywność. Dobrym przykładem tego zjawiska jest Hiszpania, w której dwa lata po wprowadzeniu do użycia fluorochinolonów w weterynarii, ponad połowa izolowanych od pacjentów szczepów *Campylobacter* była oporna na ten chemioterapeutyk (4).

## MATERIAŁ I METODY

1. Izolacja i wstępna identyfikacji termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*.

Termotolerancyjne bakterie z rodzaju *Campylobacter* izolowano z produktów drobiarskich zgodnie z procedurą opisaną w Polskiej Normie: PN-EN ISO 10272-1:2006 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania bakterii z rodzaju *Campylobacter*”.

2. Oznaczanie wrażliwości szczepów *Campylobacter* spp. na ciprofloksacyne i tetracycline.

Szczypty *Campylobacter* charakteryzowano, w oparciu o metodę PCR, kierunku obecności genu *tet*(O) (oporność na tetracykliny) oraz punktowej mutacji w kodonie 86 genu *gyrA* kodującego podjednostkę A topoiizomerazy II (oporność na fluorochinolony).

Obecność genu *tet* (O) oznaczano wykorzystując startery: *tet1* 5'-GGCGTT TTGTTTATGTGCG-3' i *tet2* 5'-ATGGACAACCCGACAGAAGC-3', mutację Thr 86 w genie *gyrA* (*C. jejuni*) badano z udziałem starterów *gyrA1* 5'-TTTTTAGCAAAGATTCTGAT-3' i *gyrA2* 5'-CAAAGCATCATAAACTGCAA-3'. Natomiast mutację Thr 86 w genie *gyrA* (*C. coli*) z wykorzystaniem starterów *gyrA3* 5'-TATGAGCGTTATTATCGGTC-3' oraz *gyrA4* 5'-TAAGGCATCGTAAACAGCCA-3'.

Kolonie zawieszano w 40 µl H<sub>2</sub>O z 10 µl żywicy chelatującej Chelex-100. Po 15 minutach inkubacji w 100°C próbkę odwirowywano. Do amplifikacji pobierano 2 µl supernatantu. Przygotowywano 25 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2,5 µl 10x bufor, 2 µl (25 mM) MgCl<sub>2</sub>, 1 µl (10 mM) dNTP, po 1 µl (10µM) odpowiednich starterów oraz 1µl (1U) Taq polimerazy.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

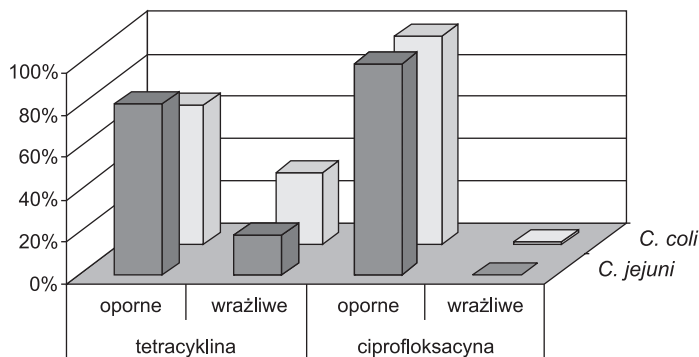
W Pracowni Mikrobiologii w latach 2008–2009 przeprowadzono badania w kierunku wykrywania obecności termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Przebadano łącznie 134 próbki mięsa drobiowego pochodzącego z handlu detalicznego. W 110 próbkach stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Campylobacter*, co stanowiło 82,1% wszystkich przebadanych próbek. Spośród czterech gatunków *Campylobacter* zaliczanych do grupy termotolerancyjnych (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* i *C. lari*) najczęściej izolowano *C. coli* – jego obecność stwierdzano w 84 próbach, co stanowiło 76%. Natomiast z 26 prób (24%) wyizolowano *C. jejuni*. W żadnej z próbek nie stwierdzono obecności dwóch pozostałych gatunków.

Oznaczenie wrażliwości na ciprofloksacyne 110 wyizolowanych szczepów *Campylobacter* spp., przeprowadzone metodą PCR, wykazało, że wszystkie szczepy *C. jejuni* i 98,8% *C. coli* posiadały punktową mutację w kodonie 86 genu *gyrA*. Efektem wystąpienia tej mutacji była zamiana treoniny na izoleucynę, co powodowało powstanie zmienionego białka pozbawionego zdolności wiązania się z cząsteczką ciprofloksacyny. Szczepy wrażliwe na ciprofloksacyne nie posiadały tej mutacji. Otrzymane wyniki badań wskazują na bardzo wysoki odsetek szczepów *Campylobacter* spp. opornych na ciprofloksacyne.

Wyniki te są zbieżne z danymi pochodzącymi z innych krajów europejskich. Z badań raportowanych przez Sáenz i współpr. wynika, iż w Hiszpanii wśród szczepów *Campylobacter* wyizolowanych z mięsa brojlerów aż 99% było opornych na ten chemioterapeutyk (5). Potwierdzają to wyniki raportu EFSA, dotyczące oporności na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki bakterii *Campylobacter* izolowanych z drobiu. W 2006 roku w krajach takich, jak Hiszpania, Włochy i Holandia stwierdzano najwyższy odsetek szczepów *Campylobacter* opornych na ciprofloksacyne, wynoszący odpowiednio dla *C. jejuni* 94%, 57% i 56% oraz dla *C. coli* 93%, 73% i 67% (6). W badaniach prowadzonych w Słowenii i Belgii również stwierdzono wysoki stopień oporności wśród szczepów *Campylobacter* izolowanych z żywności. I tak w Słowenii odsetek, izolowanych z mięsa drobiowego dostępnego na rynku detalicznym, szczepów *C. coli* opornych na ciprofloksacyne wynosił 76%, natomiast w Belgii 62% szczepów *C. jejuni* izolowanych z brojlerów (7, 8).

W ostatnich latach na całym świecie obserwuje się wzrost liczby zakażeń u ludzi wywołanych przez pałeczki *Campylobacter* oporne na fluorochinolony, w tym ciprofloksacyne (9, 10, 11). Z uwagi na fakt, iż ciprofloksacyne nie jest stosowana u dzieci poniżej 16 roku życia prawdopodobnie wysoki odsetek szczepów opornych ma swoje przyczyny w zbyt częstym użyciu fluorochinolonów w leczeniu zwierząt, zwłaszcza na fermach drobiu.

Wszystkie szczepy *Campylobacter*, wyizolowane z produktów drobiarskich, badano również w kierunku obecności genu *tet(O)*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż odsetek szczepów *Campylobacter* opornych na tetracycline wynosił dla *C. jejuni* aż 80,8%, natomiast dla *C. coli* 65,5% (ryc. 1).



Ryc. 1. Występowanie szczepów *C. coli* i *C. jejuni* opornych/wrażliwych na tetracycline i ciprofloksacyne.  
Fig. 1. Occurrence of *C. coli* and *C. jejuni* resistant/susceptible to ciprofloxacin and tetracycline.

Wysoka oporność na tetracykliny bakterii izolowanych z żywności, w tym również pałeczek *Campylobacter*, stanowi poważny problem w wielu krajach europejskich. W 2006 roku w Hiszpanii i Francji odsetek szczepów *Campylobacter* opornych na tetracyklinę wynosił odpowiednio dla *C. coli* 89,7% i 86,4%, dla *C. jejuni* 82,4% i 57,1% (EFSA 2007). Natomiast w Niemczech i Włoszech stwierdzono, że odsetek szczepów opornych był znacznie mniejszy i wynosił odpowiednio 45% i 48,2% (12, 13).

Tetracykliny jako antybiotyki o szerokim spektrum działania, należą do jednej z grup antybiotyków najszerszej stosowanych, a oporność bakterii na tetracykliny stanowi poważny problem medyczny. Wśród szczepów *C. jejuni*, izolowanych od ludzi, oporność na tetracyklinę jest równie wysoka i wynosi w Kanadzie 50% oraz w Hiszpanii 72% (14, 10).

## WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują na wysoki odsetek szczepów opornych na ciprofloksacynę i tetracyklinę wśród *Campylobacter* spp. izolowanych z produktów drobiowych obecnych na rynku detalicznym.

E. Maćkiw, K. Rzewuska, K. Tomczuk, D. Korsak

### RESISTANCE TO CIPROFLOXACIN AND TETRACYCLINE OF *CAMPYLOBACTER* SPP. STRAINS ISOLATED FROM POULTRY PRODUCTS

#### Summary

The research was carried out in the period of 2008–2009. Number of *Campylobacter* spp. strains were isolated from the food samples of animal origin to determine their susceptibility to fluoroquinolones (ciprofloxacin) and tetracyclines (tetracycline). Total of 134 samples of poultry meat from retail market was taken for the analysis. *Campylobacter* spp. was found in 110 samples, what makes 82.1% of the total number of samples. *Campylobacter coli* was isolated most frequently and its presence in 84 samples was demonstrated (76%), whereas *Campylobacter jejuni* was found in 26 samples (24%). The results of the research concerning antibiotic resistance revealed 100% *C. jejuni* and 98.8% *C. coli* ciprofloxacin resistant strains. Among tetracycline resistant strains 65.5% was estimated as *C. coli* and 80.8% as *C. jejuni*.

## PIŚMIENNICTWO

1. Parisi A., Lanzilotta S.G., Andante N., Normalno G., Di Modugno G., Dambrosio A., Montana C.O.: Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. Veterinary Research Communications, 2007; 31: 113-123. – 2. Krutkiewicz A., Klimuszko D.: Mechanizmy oporności pałeczek *Campylobacter* spp. na chemioterapeutyki. Post. Mikrobiol., 2008; 47: 489-495. – 3. Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I.: Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg. Infect. Dis., 2001; 7: 24-34. – 4. Jagusztyn-Krynicka E., Wyszyńska A., Łasica A.M.: Oddziaływanie *Campylobacter jejuni* z komórkami eukariotycznymi- komensalizm a chorobotwórczość. Post. Mikrobiol., 2006; 45: 11-17. – 5. Sáenz Y., Zarazaga M., Lantero M., Gastañares M.J., Baquero F., Torres C.: Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals, Foods, and Humans in Spain in 1997–1998. Antimicrob. Agents

Chemother., 2000; 44(2): 267–271. – 6. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses. Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal, 2007; 130. – 7. Kurincic M., Berce I., Zorman T., Mozina S.S.: The prevalence of multiple antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from retail poultry meat. Food Technol. Biotechnol., 2005; 43: 157- 163. – 8. Van Looveren M., Daube G., De Zutter L., Dumont J-M., Lammens Ch., Wijdooghe M., Vandamme P., Jouret M., Cornelis M., Goossens H.: Antimicrobial susceptibilities *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. J. Antimicrob. Chemother., 2001; 48: 235-240. – 9. Wilson I.G.: Antibiotic resistance of *Campylobacter* in raw retail chickens and imported chicken portions. Epidemiol. Infect., 2003; 131: 1181-1186. – 10. Prats G., Mireli B., Llovet T.: Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob. Agents Chemother., 2000; 44: 1140-1145.

11. Wardak S., Szych J., Zasada A.A., Gierczyński R.: Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. Antimicrob. Agents and Chemother., 2007; 51: 1123-1125. – 12. Lubert P., Wagner J., Hahn H., Bartelt E.: Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated in 1991 and 2001–2002 from Poultry and Humans in Berlin, Germany. Antimicrob. Agents Chemother., 2003; 47: 3825-3830. – 13. Pezzotti G., Serafin A., Luzzi I., Mioni R., Milan M., Perin R.: Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. Inter. J. Food Microbiol., 2003; 82: 281-287. – 14. Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.N., Connell S.R., Taylor D.E.: Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with Special Reference to *tet(O)*-Mediated Tetracycline Resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 2004; 48: 3442-3450.

Adres: 02-903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63.