

WIOLETA CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA,
LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

*Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Plac Cieszyński 1, 10-719 Olsztyn
E-mail: wioleta.chajECKa@uwm.edu.pl*

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI BAKTERII Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* WYSTĘPUJĄCYCH W ŻYWNOŚCI

WSTĘP

Nadużywanie antybiotyków i chemioterapeutyków oraz ich niewłaściwe stosowanie doprowadziło do globalnego zagrożenia, jakim jest powstawanie i szerzenie się mechanizmów oporności drobnoustrojów. Pierwszym krokiem do ograniczenia oporności jest rozpoznanie sytuacji epidemiologicznej, poprzez monitorowanie antybiotykooporności drobnoustrojów oraz różnych źródeł, z których mogą pochodzić odporne szczepy. Niezwykle istotnym środowiskiem może okazać się żywność, która zależnie od asortymentu i technologii przetwarzania, stanowi doskonałe podłoże dla wzrostu drobnoustrojów. Współczesna produkcja żywności, ze względu na szerokie stosowanie substancji przeciwbakteryjnych i intensywną wymianę handlową, sprzyja pojawianiu się i rozprzestrzenianiu drobnoustrojów opornych.

Przez lata zjawisko antybiotykooporności wiązano jedynie ze środowiskiem szpitalnym. Dopiero wzrastająca wiedza na temat oporności bakterii na antybiotyki i mechanizmów jakie towarzyszą jej przekazywaniu, spowodowała zainteresowanie badaczy jej epidemiologią. Selekcja szczepów opornych to nie tylko wynik nadużywania antybiotyków w środowisku szpitalnym, ale także niewłaściwe ich stosowanie m.in. w rolnictwie. Po wprowadzeniu zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w Europie, hodowcy zaczęli praktykować podawanie antybiotyków w formie dopuszczonych pasz leczniczych w hodowli trzody chlewnej, by-

dła, królików i drobiu. Antybiotyki stosowano także w uprawach roślin i owoców oraz hodowli pszczoł (DING i HE 2010). Zatem źródłem szczepów opornych może być mięso zwierząt hodowlanych, owoce, warzywa czy woda. Obecność szczepów antybiotykoopornych wśród mikroorganizmów występujących w żywności sugeruje, że mogą one pełnić znacznie ważniejszą niż początkowo sądzono rolę w przenoszeniu genów kodujących oporność na antybiotyki. Kluczowym miejscem w transmisji oporności pomiędzy środowiskiem a człowiekiem może być także łańcuch pokarmowy (GAZZOLA i współaut. 2012). Stanowiąc mikroflorę żywności i równocześnie mając zdolność do przeżywania w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego, paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* mają kontakt z wieloma rodzajami bakterii, zatem mają warunki, aby przekazywać im własny materiał genetyczny.

Badania szczepów klinicznych wskazują na niezwykle potencjał enterokoków w wymianie materiału genetycznego pomiędzy sobą, jak i z innymi gatunkami (JENSEN i współaut. 2010). Wiedza na temat molekularnych oraz genetycznych podstaw antybiotykooporności i wirulencji paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* izolowanych ze źródeł innych, niż materiał kliniczny wydaje się być ograniczona. Biorąc pod uwagę wzrastającą rolę enterokoków w zakażeniach szpitalnych, badacze często podkreślają potrzebę, a nawet konieczność szerszych badań bakterii należących do tego rodzaju.

ENTEROCOCCUS SPP. – CHARAKTERYSTYKA, WYSTĘPOWANIE

Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* powszechnie występują w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, stanowiąc część komensalnych bakterii wchodzących w skład flory fizjologicznej. Studia nad ekologią i epidemiologią *Enterococcus* spp. wskazują, że wraz z odchodami bakterie te trafiają do środowiska, które ze względu na duże zdolności adaptacyjne z łatwością kolonizują. Stąd powszechne ich występowanie w glebie, wodach, ściekach, na roślinach i owocach. Tą drogą dostają się następnie do surowców pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, jak mleko, mięso, warzywa (GIRAFFA 2002).

Powszechność występowania paciorkowców *Enterococcus* spp. w żywności wynika głównie z ich oporności na niekorzystne warunki środowiska panujące podczas procesu produkcji i przechowywania żywności oraz dużych zdolności adaptacyjnych tych drobnoustrojów. Są zdolne do wzrostu w szerokim zakresie temperatur i niesprzyjających warunkach, jak wysoka zawartość soli żółci i niskie pH. Rozwijają się zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Mają zdolność do przeżywania w temperaturze 63,5°C przez 30 minut, co kwalifikuje je, jako jedne z najbardziej ciepłopornych bakterii, zaraz po drobnoustrojach przetrwalnikujących (FOULQUIÉ MORENO i współaut. 2006). Dane literaturowe podają, że paciorkowce rozwijają się w obecności NaCl o stężeniu od 5 do 10%, przy 40% stężeniu soli żółciowych oraz w zakresie pH od 4,6 do 9,9 (VAN DEN BERGHE i współaut. 2006). Właściwości te sprawiają, że paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* stanowią liczną mikroflorę „resztkową” serów (zarówno z mleka surowego jak i pasteryzowanego), wędlin, w tym bardzo często kiełbas fermentowanych, ale są również izolowane z produktów roślinnych i wysoko przetworzonej żywności gotowej do spożycia.

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ PACIORKOWCÓW Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS*

Oporność na antybiotyk to zdolność mikroorganizmu do „przeciwstawienia się” jego działaniu bakteriostatycznemu bądź bakteriobójczemu. Bakterie wykazują oporność naturalną (wrodzoną) oraz nabytą. Oporność naturalna najczęściej jest efektem nieskutecznej penetracji antybiotyku przez struktury ściany i błony komórkowej, w związku z obecnością elementów hamujących możliwości jego dotarcia do celu. Taka oporność jest zazwyczaj kodowana chromosomalnie

i w związku z tym nie podlega przenoszeniu. Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* charakteryzują się opornością wrodzoną na: cefalosporyny (wszystkich generacji), trimetoprim/sulfametoksazol, linkosamidy (klindamycyna), niskie stężenia aminoglikozydów, ponadto gatunki *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* wykazują oporność na niskie stężenia glikopeptydów (fenotyp VanC), natomiast *E. faecium* obniżoną wrażliwość na penicyliny (HOLLENBECK i RICE 2012).

O ile oporność wrodzona jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku, związana z informacją zakodowaną w chromosomie bakteryjnym, o tyle oporność nabyta pojawia się w wyniku zmian w genomie. Zmiany takie mogą zachodzić na skutek mutacji punktowych (losowych), które najczęściej są błędami w sekwencji nukleotydowej materiału genetycznego lub mogą być wynikiem nabywania od innych bakterii opornych genu lub zespołów genów determinujących oporność na antybiotyki. To drugie zjawisko zachodzi znacznie częściej, natomiast oba prowadzą w konsekwencji do trwałego dziedziczenia oporności, a także do jej rozprzestrzeniania drogą transferu horyzontalnego (WERNER i współaut. 2012). Na skutek horyzontalnego transferu genów w komórkach pojawiają się nowe geny oporności, przenieszone na ruchomych elementach genetycznych. Niejednokrotnie prowadzi to do powstania tzw. szczepów wieloopornych (ang. multi drug resistance, MDR), czyli wykazujących niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej klas, aktywnych wobec danego gatunku drobnoustrojów. Pojawianiu się szczepów wieloopornych sprzyja jednoczesne kodowanie kilku różnych genów oporności na tym samym elemencie genetycznym. Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* wykazują oporność nabytą na coraz więcej grup antybiotyków, m.in. na β -laktamy, glikopeptydy, wysokie stężenia aminoglikozydów, tetracykliny, makrolidy, linezolid, streptograminy, fluorochinolony czy chloramfenikol (WERNER i współaut. 2012).

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE

Antybiotyki β -laktamowe działają bakteriobójczo, hamując syntezę peptydoglikanu, głównego składnika ściany komórkowej bakterii. Peptydoglikan składa się z łańcuchów polisacharydowych i łańcuchów peptydowych tworzących między sobą wiązania krzyżowe. Proces tworzenia wiązań katalizowany jest przez enzymy zlokalizowane w błonie komórkowej bakterii, które ze względu na zdolność do wiązania się z antybiotykami β -laktamowymi (m. in. penicyliną) nazywa-

ne są białkami wiążącymi penicylinę (ang. penicillin binding proteins, PBP). Związanie się antybiotyku z białkiem PBP powoduje zahamowanie jego funkcji enzymatycznej, a tym samym zahamowanie syntezy peptydoglikanu. Bakterie pozbawione usieciowanego peptydoglikanu stają się wrażliwe na warunki środowiska i giną niszczone przez własne enzymy autolityczne.

Oporność enterokoków na β -laktamy może być związana z dwoma mechanizmami. Może to być wynik nadprodukcji białek wiążących penicylinę PBP5, które ze względu na niskie powinowactwo do β -laktamów nie wiążą się z nimi, bądź wiążą się w niewielkim stopniu. Białka PBP5 mogą ponadto przejmować funkcje enzymatyczne innych białek, a tym samym umożliwiać komórce syntezę peptydoglikanu w obecności antybiotyku (RICE i współaut. 2004). Drugim mechanizmem oporności jest synteza β -laktamaz hydrolizujących pierścieni β -laktamowy antybiotyku, które na skutek tego nie hamują funkcji enzymatycznych białek PBP. U paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* geny kodujące oporność na antybiotyki β -laktamowe umiejscowione są na plazmidach.

OPORNOŚĆ NA GLIKOPEPTYDY

Narastająca oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe spowodowała konieczność szukania innych, skutecznych chemioterapeutyków. Duże nadzieje wiązano z wprowadzoną w 1956 r. wankomycyną oraz w 1978 r. teikoplaniną. Bakteriobójcze działanie antybiotyków glikopeptydowych, podobnie jak β -laktamów, polega na hamowaniu syntezy peptydoglikanu. Proces ten odbywa się poprzez łączenie antybiotyku z bocznymi łańcuchami peptydowymi, co uniemożliwia tworzenie wiązań krzyżowych. Glikopeptydy zaburzają także syntezę RNA i przepuszczalność błony komórkowej.

Po wielu latach skutecznego stosowania glikopeptydów, w 1988 r. odnotowano pierwszy szczep odporny na wysokie stężenie glikopeptydów, wankomycynę i teikoplaninę. Badania prowadzone na szczepach opornych na wankomycynę wykazały, że antybiotyk nie inaktywuje enzymów bakteryjnych, ale wywołuje ekspresję genów odpowiedzialnych za pojawienie się nowych białek. Oporność paciorkowców *Enterococcus* spp. na wankomycynę jest wynikiem syntezy zmienionych prekursorów mureiny, D-alanino-D-mleczanu i D-alanino-D-seryny. Dipeptydy te włączane są zamiast D-alanylo-D-alaniny w łańcuch prekursora, który bierze udział w budowie ściany komórkowej, co uniemożliwia wankomycynie blokadę syntezy peptydoglika-

nu. Gdy w miejsce D-alaniny podstawiony zostanie D-mleczan, nie dochodzi do wytworzenia wiązania pomiędzy glikopeptydem a prekursorem peptydoglikanu. Jeżeli jest to D-seryna, następuje osłabienie wiązania na skutek zmiany jego struktury przestrzennej (GHOLIZADEH i COURVALIN 2000).

Pod względem oporności na wankomycynę enterokoki charakteryzują się dużą niejednorodnością zarówno fenotypową, jak i genotypową (Tabela 1). Szczepy wytwarzające prekursorsy peptydoglikanu, kończące się dipeptydem D-Ala-D-Lac, wykazują oporność na wysokie stężenia wankomycyny i teikoplaniny, natomiast zakończone D-Ala-D-Ser, jedynie na niskie stężenia wankomycyny (COURVALIN 2005). Na podstawie poziomu warunkowanej oporności na wankomycynę, możliwości jej indukowania, sposobu rozprzestrzeniania się, a także oporności krzyżowej na teikoplaninę, opisano 9 różnych fenotypów oporności: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE (GHOLIZADEH i COURVALIN 2000), VanG (MCKESSAR i współaut. 2000), VanL (BOYD i współaut. 2008), VanM (XU i współaut. 2010) oraz VanN (LEBRETON i współaut. 2011). Ze względu na szybkość oraz częstość rozprzestrzeniania się, największe znaczenie mają fenotypy VanA i VanB, których geny zlokalizowane są na ruchomych elementach genetycznych. Fenotyp VanA indukowany przez wankomycynę i teikoplaninę, charakteryzuje enterokoki odporne na wysokie stężenia tych antybiotyków. Przenoszenie genów *vanA* odbywa się przez transpozon *Tn1546* znajdujący się na plazmidzie lub fragmencie chromosomu. Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* o fenotypie VanB wykazują oporność na różne stężenia wankomycyny i wrażliwość na teikoplaninę. Induktorem tego fenotypu jest wyłącznie wankomycyna. Geny *vanB* przekazywane są między komórkami drobnoustrojów za pomocą dużych koniugacyjnych elementów genetycznych, takich jak transpozon: *Tn1549*, *Tn1547*, *Tn5382*, które mogą być przenoszone między chromosomami (GHOLIZADEH i COURVALIN 2000).

Gatunki *E. casseliflavus*, *E. flavescens* i *E. gallinarum* charakteryzują się wrodzoną opornością typu VanC na niskie stężenia wankomycyny, przy jednoczesnej całkowitej wrażliwości na teikoplaninę. Oporność typu VanC najczęściej regulowana jest konstytutywnie; sporadycznie zdarzają się szczepy, u których występuje oporność indukowana (DUTTA i REYNOLDS 2002). Determinanty oporności tego typu znajdują się na chromosomie i nie ulegają transferowi horyzontalnemu. W komórkach *E. gallinarum* za kodowanie białka podobnego do ligaz D-alanylo-D-alaniny odpowiedzialny jest gen *vanC*, u *E. casseliflavus* – *vanC2*, natomiast u *E.*

Tabela 1. Fenotypy oporności na glikopeptydy najczęściej występujące u paciorkowców z rodzaju *Enterococcus*.

Fenotyp	VanA	VanB1/B2/B3	VanC1/C2/C3	VanD	VanE	VanG
Typ oporności	nabyta	nabyta	wrodzona	nabyta	nabyta	nabyta
Ekspresja oporności	indukowana	indukowana	konstytutywna lub indukowana	konstytutywna lub indukowana	indukowana	indukowana
MIC VA	64–1000	4–1000	2–32	64–256	8–32	16
MIC TEC	16–512	0,5–1	0,5–1	4–64	0,5	0,5
Dipeptyd końcowy	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac
Lokalizacja genów oporności	Tn1546	Tn1547, Tn1549, Tn5382	chromosom	chromosom	chromosom	chromosom
Występowanie						
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>		
	<i>E. durans</i>	<i>E. bovis</i>	<i>E. flavescens</i>			
	<i>E. gallinarum</i>					
	<i>E. casseliflavus</i>					
	<i>E. mundtii</i>					
	<i>E. raffinosus</i>					

flavescens – *vanC3*. Wankomycynooporność VanD, VanE i VanG występuje niezwykle rzadko. Enterokoki o fenotypie VanD charakteryzują się średnim stopniem oporności na wankomycynę i teikoplaninę. Geny *vanD* znajdują się na chromosomie; nie ma doniesień o możliwości ich transferu, co może tłumaczyć rzadkie występowanie tego fenotypu u enterokoków (DEPARDIEU i współaut. 2004). Oporność typu VanE i VanG została opisana u pojedynczych szczepów z gatunku *E. faecalis*. Oba fenotypy charakteryzują się opornością na niskie stężenia wankomycyny i wrażliwością na teikoplaninę, mimo że syntetyzują inne prekursorzy peptydoglikanu (Tabela 1).

OPORNOŚĆ NA WYSOKIE STĘŻENIA AMINOGLIKOZYDÓW

Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* wykazują wrodzoną oporność na niskie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych, na skutek ograniczonego przenikania tych związków przez ścianę komórkową. Jest to związane z białkami biorącymi udział w transporcie elektronów, a zatem wynika ze względnie beztlenowego metabolizmu paciorkowców. Zazwyczaj wartości minimalnego stężenia hamującego (ang. minimal inhibitory concentration, MIC) dla aminoglikozydów

wahają się w przedziale od 4 mg/ml do 256 mg/ml (CHOW 2000).

Nabyta oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy (HLAR) może być związana z mutacją w rybosomach, natomiast najczęściej jest efektem blokowania wiązania antybiotyku z miejscem docelowym, czyli podjednostką 30S bakteryjnego rybosomu, na skutek modyfikacji antybiotyku poprzez dołączanie do jego cząsteczki dodatkowych reszt chemicznych (acylowych, nukleotydowych, fosforylowych) (WOODFORD 2005). Enzymy modyfikujące aminoglikozydy, tzw. AME (ang. aminoglycoside-modifying enzymes), mogą wykazywać aktywność acetylotransferazy (AAC), fosfotransferazy (APH) lub nukleotydylotransferazy (ANT). Geny enzymów AME przenoszone są na ruchomych elementach genetycznych, plazmidach i transpozonach, co sprzyja horyzontalnemu rozprzestrzenianiu się oporności. Większość opornych na aminoglikozydy enterokoków posiada enzym bifunkcyjny o aktywności acetylazofosfotransferazy/fosfotransferazy (*Aac(6')-Aph(2'')*), który modyfikuje wszystkie aminoglikozydy, poza streptomycyną (RICE 1998). Gen *aph(2'')-Ia-aac(6')* umiejscowiony jest na transpozonie (Tn5281, Tn5384), które występują zarówno na chromosomie, jak i na plazmidach (Tabela 2). W ostatnich latach, poza najbardziej rozpowszechnionym

Tabela 2. Mechanizmy oporności na aminoglikozydy występujące u enterokoków.

Mechanizm oporności	Enzym	Fenotyp	Kodowanie oporności	Gospodarz	Źródło
Niska przepuszczalność ściany komórkowej	–	oporność na niskie stężenia aminoglikozydów	wrodzona	<i>E. faecalis</i>	GALLOWAY-PEÑA i współaut. 2009
Mutacje w rybosomie	–	oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów (MIC>128µg/ml)	sporadycznie	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	ARIAS i współaut. 2007b
Enzym modyfikujący aminoglikozydy	Aac(6')-Ii	oporność na niskie stężenia tobramycyny i kanamycyny	wrodzona	<i>E. faecium</i>	GALLOWAY-PEÑA i współaut. 2011
	Aph(3')-IIIa	oporność na niskie stężenia kanamycyny	pJH1	<i>E. faecium</i>	LASCOLS i współaut. 2011
	Ant(4'')-Ia	oporność na niskie stężenia tobramycyny, kanamycyny, neomycyny, amikacyny	pIP810	<i>E. faecium</i>	HENRY i współaut. 2010
	Aph(2'')-Ia-Aac(6)Ie	oporność na wysokie stężenia gentamycyny	Tn5281	<i>E. faecalis</i>	RICE 1998
	Aph(2'')-Ib		Tn5384 nieznana	<i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>	MOELLERING i współaut. 1999
	Aph(2'')-Ic		pYN134	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	ONO i współaut. 2005
	Aph(2'')-Id		nieznana	<i>E. faecium</i>	CLARK i współaut. 2011
	Ant(6')-Ia	oporność na wysokie stężenia streptomycyny	Tn1546, Inc.18,	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	BÉRENGER i współaut. 2011
	Ant(3'')-Ia		Tn5382 pR538-1	<i>E. faecium</i>	ARIAS i współaut. 2007a
Metylotransferaza modyfikująca rybosom	EfmM	oporność na kanamycynę i tobramycynę	wrodzona	<i>E. faecium</i>	FONTANA i współaut. 1994

i najlepiej poznanym genem *aac(6')-aph(2'')Ia*, wykryto 3 inne geny odpowiadające za oporność na gentamycynę: *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* oraz 2 geny kodujące oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów innych niż gentamycyna: *aph(3'')-IIIa* oraz *ant(4'')-Ia* (Tabela 2). Gen *aph(3'')-IIIa* koduje fosfotransferazę aminoglikozydową Aph(3'')-IIIa, co fenotypowo objawia się opornością na kanamycynę, natomiast gen *ant(4'')-Ia* koduje adenylotransferazę aminoglikozydową, co skutkuje występowaniem oporności na niskie stężenia tobramycyny, kanamycyny, neomycyny i amikacyny (HENRY i współaut. 2010, LASCOLS i współaut. 2011).

OPORNOŚĆ NA TETRACYKLINY

Tetracykliny należą do grupy antybiotyków bakteriostatycznych, hamujących syntezę białek w komórkach bakterii. Mechanizm działania polega na wiązaniu się antybiotyku z rybosomem 30S i blokowaniu aminoacylo-tRNA w miejscach akceptorowych m-RNA. Uniemożliwia to translację i zaburza procesy energetyczne w komórce.

Wykształcone przez paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* mechanizmy hamujące działanie tetracyklin polegają na przyłączeniu genów oporności *tetM*, *tetO* lub *tetW* do rybosomów bakteryjnych, co blokuje możliwość wiązania antybiotyku do rybosomu. Innym mechanizmem ochronnym jest usunięcie antybiotyku z komórki zaraz po wniesieniu. Za aktywny transport antybiotyku z komórki (tzw. mechanizm efflux) odpowiedzialne są geny *tetL* i *tetK* (ROBERTS 2005). U paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* najczęściej występuje gen *tetM*, zlokalizowany zazwyczaj na chromosomie bakteryjnym. Gen *tetM* może być przenoszony na transpozonach koniugacyjnych z rodziny Tn916/Tn1545. Na transpozonie Tn916 występuje on samodzielnie, natomiast na Tn1545 jego obecność jest sprzężona z genem *ermB* kodującym oporność na antybiotyki z grupy makrolidów. Taka lokalizacja genów wyjaśnia zjawisko częstego występowania w izolatach opornych na tetracyklinę równoczesnej oporności na makrolidy lub/i chloramfenikol. Gen *tetK* najczęściej występuje na małych plazmidach i może ulegać integracji

do chromosomu. Jest on odpowiedzialny za kodowanie białka błonowego, którego celem jest aktywne usuwanie z komórki wszystkich tetracyklin, poza minocykliną.

Tetracyklina jest stosunkowo niedrogiem antybiotykiem o szerokim spektrum działania, zatem często stosowanym profilaktycznie w weterynarii (MARTINEZ 2009). Analiza danych literaturowych wskazuje, że oporność na tetracykliny jest jedną z najczęściej notowanych oporności wśród enterokoków izolowanych z żywności, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego. Zazwyczaj jest ona związana z obecnością genu *tetM* lub/i *tetL*, zwłaszcza w izolatach z drobiu, geny *tetO* i *tetS* częściej występują w izolatach z wieprzowiny i wołowiny, natomiast geny *tetK* dominują w izolatach środowiskowych, weterynaryjnych, a także klinicznych ludzkich (ROBERTS 2005, GAZZOLA i współaut. 2012).

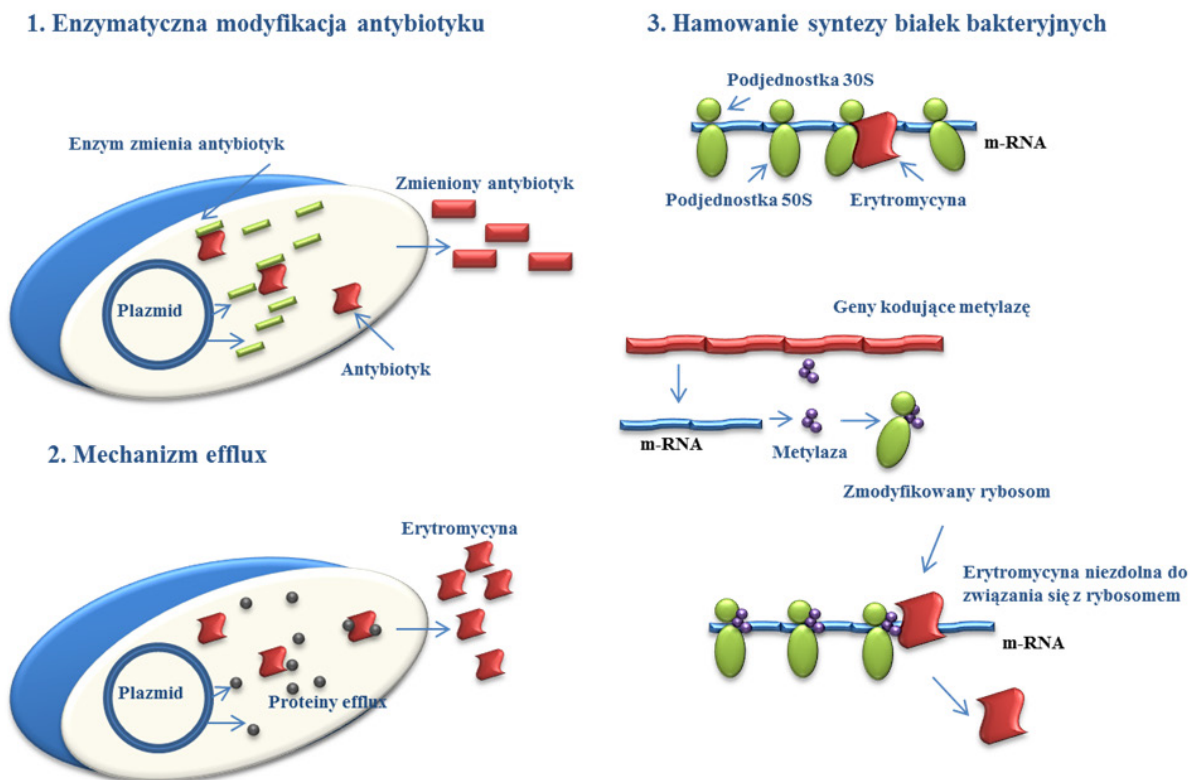
OPORNOŚĆ NA MAKROLIDY, LINKOZAMIDY, STREPTOGRAMINY B

Makrolidy, linkozamidy i streptograminy to antybiotyki stosowane zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Antybiotyki te są szeroko stosowane w leczeniu

zwierząt hodowlanych (COLLIGNON i współaut. 2009).

Mechanizm działania makrolidów, takich jak erytromycyna, polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych poprzez odwracalne wiązanie się z podjednostką 50S rybosomu bakteryjnego, co zakłóca translokację peptydylo-tRNA (PORTILLO i współaut. 2000). Działanie to ma głównie efekt bakteriostatyczny.

Dotychczas opisane mechanizmy oporności na antybiotyki z grupy MLS_B to: aktywne usuwanie antybiotyków z komórki, inaktywacja enzymatyczna bądź modyfikacja poprzez mutację punktu uchwytu – białka 23S mRNA (Ryc. 1). Ostatni mechanizm wyznacza fenotyp oporności na wszystkie makrolidy, linkozamidy i streptograminy (MLS_B). Z racji nakładających się miejsc wiązania, przyłączanie linkozamidów i streptogramin grupy B jest hamowane, co prowadzi do krzyżowej oporności na wszystkie MLS_B. Mechanizm MLS_B związany jest z występowaniem genów *ermA*, *ermB* lub *ermC* kodujących N-6 metylotransferazę powodującą metylację adeniny w 23S rRNA, który jest miejscem działania antybiotyku (ZOU i współaut. 2011). Gen *ermA* jest indukcyjny i występuje na transpozonach umiejscowionych na



Ryc. 1. Mechanizmy oporności bakterii na makrolidy, linkozamidy, streptograminy B (MLS_B).

(wg DEPARDIEU i współaut. 2004, COURVALIN 2005, ŚLEDZIŃSKA i współaut. 2009).

chromosomie, gen *ermB* jest konstytutywny i występuje zazwyczaj na transpozonach wbudowanych w plazmidy, z kolei gen *ermC* może być indukcyjny lub konstytutywny i lokalizuje się na małych plazmidach (THUMU i HALAMI 2012).

Enzymatyczna modyfikacja antybiotyku wiąże się z aktywnością fosfotransferazy (MPH) – geny *mph* (oznaczają tylko oporność na makrolidy), nukleotydylotransferazy – gen *lnu(A)* (oporność tylko na linkozamidy) lub acetylotransferazy – geny *sat*, *vat* (oporność tylko na streptograminy A). Z kolei za aktywne usuwanie antybiotyku z komórki odpowiedzialne mogą być geny *mefA/E*, *mre(A)*, odpowiadające za oporność na makrolidy, oraz gen *msrA*, wyznaczający oporność na makrolidy i streptograminy (PORTILLO i współaut. 2000).

Lokalizacja genów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki z grupy MLS_B na ruchomych elementach genetycznych jak transpozon czy plazmidy, sprzyja horyzontalnemu rozprzestrzenianiu się oporności na nie. Ponadto, bardzo często geny te zlokalizowane są na transpozonach, obok wielu innych genów kodujących oporność na inne grupy antybiotyków, m.in. na tetracykliny (*tetM*) (ROBERTS 2008). Dane literaturowe wskazują także na możliwość transferu tych genów nie tylko w obrębie gatunku czy rodzaju, ale także pomiędzy rodzajami, m.in. od *E. faecalis* do *Listeria monocytogenes* (ROBERTS 2011).

MOŻLIWOŚCI PRZENOSZENIA I PRZEKAZYWANIA GENÓW OPORNOŚCI PRZEZ PACIORKOWCE Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS*

Narastająca oporność na antybiotyki u paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* jest, między innymi, wiązana z wykształceniem przez nie efektywnych mechanizmów transferu genów. Badania szczepów klinicznych wskazują na niezwykle potencjał enterokoków w wymianie materiału genetycznego pomiędzy sobą, jak i z innymi gatunkami (JENSEN i współaut. 2010). W przekazywaniu genów biorą udział ruchome elementy genetyczne, które mogą być przekazywane pomiędzy różnymi gatunkami, a nawet rodzajami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (CLEWELL i współaut. 2002). Horyzontalny transfer genów (ang. HORIZONTAL *gene transfer*, HGT) pozwala bakteriom na szybkie nabywanie kompleksu nowych cech i jest kluczowym elementem ich ewolucji. Zdolność do nabywania mobilnych elementów genetycznych kodujących m.in. oporność na antybiotyki czy czynniki wirulencji, przyczyniła się do wzrostu znaczenia ente-

rokoków, zwłaszcza *E. faecalis* i *E. faecium*, jako jednych z wiodących patogenów szpitalnych (LEAVIS i współaut. 2007). Częstość i różnorodne pochodzenie mobilnych elementów genetycznych u enterokoków sugeruje, że bariery nabywania obcego DNA są bardzo słabe. U paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* transfer genów najczęściej odbywa się w wyniku koniugacji i transdukcji.

Najbardziej powszechnym mechanizmem horyzontalnego transferu genów jest koniugacja z udziałem plazmidów. U paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* za indukcję koniugacyjnego przekazywania plazmidów odpowiadają peptydy Prg i Tra, pełniące funkcję feromonów płciowych. Geny kodujące peptyd Prg umiejscowione są na plazmidzie pCF10, natomiast kodujące peptyd Tra na plazmidzie pAD1 lub transpozonach: Tn916, Tn918, Tn920, Tn925, Tn3702, Tn5381, Tn5383 (NORMAN i współaut. 2009). Rola feromonów płciowych polega na przemieszczaniu między komórkami plazmidów koniugacyjnych, ale również na mobilizowaniu do koniugacji plazmidów niekoniugacyjnych i transpozonów. Warunkiem niezbędnym do procesu koniugacji jest obecność czynników powodujących agregację komórek przy wysokiej koncentracji mieszaniny dawcy i biorcy. Feromony wydzielane przez biorców są specyficzne w stosunku do określonego dawcy (gospodarza plazmidu). Kiedy osiągną stężenie progowe, indukują syntezę substancji agregującej dawcy i ekspresję operonów koniugacyjnych plazmidu. Wytworzenie agregacji, czyli specyficznego środowiska, w którym koniugacyjne przekazywanie plazmidów jest ułatwione, jest istotnym warunkiem w środowisku płynnym. Transfer między komórkami przylegającymi do powierzchni wspomagany jest przez białka powierzchniowe EfaA i Esp.

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ PACIORKOWCÓW Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* IZOLOWANYCH Z ŻYWNOSCI

Wysoki poziom oporności bakterii z rodzaju *Enterococcus* na antybiotyki i powszechna obecność dużej ich liczby w żywności surowej, to dwa kluczowe elementy wpływające na ich obecność również w żywności gotowej do spożycia. Oporne na antybiotyki szczepy tych paciorkowców były często izolowane zwłaszcza z żywności pochodzenia zwierzęcego, jak produkty mięsne czy sery. GELSOMINO i współaut. (2003) wykazali, że antybiotykooporne enterokoki, dostając się z serem do przewodu pokarmowego człowieka, mogą zdominować jego populację, nawet, jeżeli szczepy takie występowały w tym

serze nielicznie. Z uwagi na duże zdolności adaptacyjne, enterokoki wprowadzane z pożywieniem są w stanie przejściowo lub trwale kolonizować przewód pokarmowy, wzrasta zatem niebezpieczeństwo przenoszenia genów do mikroflory zasiedlającej jelito. Badacze sugerują wręcz, że wysokie liczebności enterokoków z żywności, przenoszących geny oporności, mogą przyczyniać się do znacznego ograniczenia skuteczności terapii antybiotykowej w zakażeniach jelitowych (HAUG i współaut. 2011).

Istotnym problemem jest oporność paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z żywności na antybiotyki stosowane w leczeniu ludzi. Niewrażliwość na takie grupy chemioterapeutyków jak fluorochinolony czy oksazolidynony może być przyczyną niepowodzeń w terapii zakażeń enterokokowych. Izolaty z żywności, w tym gotowej do spożycia, wykazywały m.in. oporność na (i) ciprofloksacynę, stosowaną w pozaszpitalnych zapaleniach płuc oraz zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, (ii) norfloksacynę, stosowaną w zakażeniach układu moczowego czy (iii) linezolid, podawany w leczeniu szpitalnych i pozaszpitalnych przypadków zapalenia płuc i zakażeniach wywołanych przez enterokoki odporne na wankomycynę, w tym bakteriiem. Zazwyczaj oporność na fluorochinolony stwierdzana jest jedynie w izolatach należących do gatunków *E. faecium* i *E. faecalis*. Najczęściej są to izolaty z produktów pochodzenia zwierzęcego. Oporność na ciprofloksacynę stwierdzano w izolatach z wędlin wyrabianych rzemieślniczo w Hiszpanii (31,9%) czy Portugalii (16,5%) oraz serach miękkich we Włoszech (18,%) (BARBOSA i współaut. 2009, DELPECH i współaut. 2012, PESAVENTO i współaut. 2014). Z kolei oporność na linezolid zdecydowanie częściej występowała u izolatów z ryb i produktów rybnych (SERGELIDIS i współaut. 2013). Linezolid jest antybiotykiem podawanym przy niepowodzeniach w zwalczaniu infekcji wywołanych przez wielooporne szczepy, w tym gronkowca złocistego opornego na metycylinę (ang. methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) czy wankomycynę (ang. vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA) oraz wankomycynooporne enterokoki (ang. vancomycin resistant *Enterococci*, VRE). Linezolid wprowadzono w 2000 r., a już rok później wyizolowano pierwszy szczep odporny na ten antybiotyk, co tylko potwierdza skalę problemu, jaką jest antybiotykoooporność bakterii.

Doniesienia wskazują, że enterokoki izolowane z gotowej do spożycia żywności pochodzenia zwierzęcego prezentują bardzo podobny profil oporności do izolatów z surowego drobiu, wieprzowiny czy wołowiny (MANNU

i współaut. 2003). Potwierdza to spostrzeżenia badaczy wskazujące na możliwość transferu bakterii od zwierząt, zwłaszcza podczas wytrzewiania, ale równie często na każdym kolejnym etapie produkcji (TREMBLAY i współaut. 2012). Wiele doniesień wskazuje, że taki stan może być również konsekwencją stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt rzeźnych i drobiu (HAMMERUM 2012). Mimo że stosowanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu zwierząt jest w Europie zabronione od 2006 r., nadal są one stosowane powszechnie w medycynie weterynaryjnej w celach terapeutycznych i profilaktycznych. Nie podaje się, co prawda, antybiotyków stosowanych obecnie w leczeniu infekcji u ludzi, niemniej jednak mogą odgrywać znaczącą rolę w selekcji szczepów opornych. Szczególnie często aplikowane są antybiotyki z grupy tetracyklin, dopuszczone przez UE i FDA do stosowania w leczeniu zapalenia wątroby i błony śluzowej żołądka, chorób układu moczowo-płciowego i oddechowego oraz zakażeń bakteryjnych skóry (MARTINEZ 2009). Antybiotyki takie jak tetracyklina, oksytetracyklina, doksyicyklina czy chlorotetracyklina, stosowane są u bydła, świń, drobiu, kóz, owiec czy ryb (BEA-VEN i współaut. 2014). Stosowanie ich w weterynarii doprowadziło do presji selekcyjnej i wzrostu liczby szczepów opornych. Ponadto wykazano, że tetracyklinooporne szczepy często wykazują sprzężoną oporność na gentamycynę czy nawet wankomycynę (CHOI i WOO 2014).

Wiele opracowań wskazuje także na powszechność tetracyklinoopornych enterokoków w żywności, w tym także żywności gotowej do spożycia (DELPECH I i współaut. 2012, THUMU i HALAMI 2012). Genetyczne determinanty oporności najczęściej stwierdzone u szczepów izolowanych z żywności to geny odpowiadające za zmianę miejsca docelowego działania antybiotyku – *tetM*, oraz kodujące mechanizm aktywnego usuwania antybiotyku z komórki (tzw. pompy *efflux*) – *tetL* (DELPECH i współaut. 2012). Są to te same elementy, które najczęściej są też przyczyną oporności u szczepów szpitalnych. Zdecydowanie rzadziej w genomowym DNA bakterii z rodzaju *Enterococcus* stwierdza się obecność fragmentów kodujących geny *tetK*, *tetO* i *tetW*, które z kolei częściej stwierdzano w izolatach środowiskowych (KÜMMERER 2009).

Według danych literaturowych, u wielu enterokoków i streptokoków izolowanych z żywności surowej oraz pochodzenia klinicznego, geny kodujące oporność na tetracykliny częściej umiejscowione są na transpozonach niż plazmidach. Większość doniesień wskazuje, że paciorkowce z rodzaju *Enterococcus*, u których stwierdzono gen

tetM, posiadały także gen integrazy *int*, co wskazuje, że gen oporności na tetracyklinę zlokalizowany był na transpozonie koniugacyjnym z rodziny Tn916-Tn1545. Geny kodujące oporność na tetracykliny bardzo często umiejscowione są na transpozonie w towarzystwie genu *ermB*, uważanym za najbardziej rozpowszechniony wśród enterokoków gen kodujący oporność na makrolidy. Gen *ermB*, poza transpozonom, często zlokalizowany jest także na transpozonach Tn5384 i Tn5385 oraz plazmidach koniugacyjnych, jak *pAMβ1*, *pRE25*, *pUW1965* (HUMMEL i współaut. 2007). Należąca do makrolidów erytromycyna to antybiotyk wciąż powszechnie stosowany w leczeniu infekcji u ludzi, zwłaszcza ze stwierdzoną alergią na penicyliny. Mechanizm oporności polega na zaburzonej transporcie antybiotyku do wnętrza komórki, co powoduje zmianę miejsca docelowego działania antybiotyku. Obecność genu *ermB* często stwierdzano zarówno w szczepach z żywności, jak i w izolatach klinicznych należących do rodzaju *Enterococcus*, a także innych bakterii Gram-dodatnich, jak *Streptococcus pneumoniae* (REIJTMAN i współaut. 2013), *S. pyogenes* (PALMIERI i współaut. 2012) czy *S. aureus* (DING i współaut. 2012). Gen ten jest dominujący wśród szczepów o fenotypie MLS_B (DEL GROSSO i współaut. 2007). Obok genu *ermB*, izolaty z żywności należące do gatunków *E. faecium* i *E. faecalis* posiadają szereg innych determinant kodujących N-6 metylotransferazę (*ermA*;*ermC*) czy też odpowiedzialnych za mechanizm efflux (*mefA/E*; *msrC*) (ZOU i współaut. 2011). Mimo że geny *mefA/E* i *msrC* stwierdza się rzadko u izolatów z żywności i odpowiadają one za fenotyp o niskim stopniu oporności na makrolidy, to ich powszechność u innych bakterii Gram-dodatnich potwierdza zdolność paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* do nabywania nowych determinant oporności. Okazuje się, że gen *ermA* bardzo często stwierdzany był u opornych na makrolidy szczepów *Staphylococcus aureus* i gronkowców koagulazo-ujemnych (ZMANTAR i współaut. 2011). Z kolei gen *mefA/E* jest charakterystyczny dla opornych na makrolidy *Streptococcus pyogenes* (REINERT 2009), *Streptococcus pneumoniae* (LI i NIKAIKO 2009), *Streptococcus agalactiae* (CAI i współaut. 2007).

Obecnie, za patogeny alarmowe w środowisku szpitalnym uważane są szczepy odporne na wankomycynę. Wankomycyna jest antybiotykiem stosowanym w poważnych zakażeniach wieloopornymi enterokokami. Oporność na ten antybiotyk oznaczono między innymi u szczepów *Enterococcus* izolowanych z serów wyrabianych rzemieślniczo (GOMES i współaut. 2008). Jednak mimo oporności fe-

notypowej, analizy genotypowe nie wykazały obecności genów *vanA* i *vanB*, zatem autorzy wysunęli hipotezę, że za oporność mogły odpowiadać inne geny, jak *vanD*, *vanE* czy *vanG*. Naukowcy często tłumaczą obecność wankomycynoopornych szczepów, wśród izolatów z produktów pochodzenia zwierzęcego, stosowaniem jako dodatku do pasz awoparcyny, innego antybiotyku glikopeptydowego o zbliżonej budowie. Dane literaturowe wskazują, że tylko w krajach, gdzie awoparcyna była dopuszczona, odporne na wankomycynę izolaty pojawiały się w środowisku pozaszpitalnym. Od czasu wprowadzenia zakazu stosowania awoparcyny, odnotowuje się spadek wankomycynoopornych izolatów z produktów pochodzenia zwierzęcego. Potwierdzeniem tej hipotezy jest także fakt, że tego rodzaju izolatów nie stwierdzano w środowisku pozaszpitalnym w Stanach Zjednoczonych, gdzie awoparcyna nigdy nie była dopuszczona, jako stymulator wzrostu (TREMBLAY i współaut. 2011).

Podobna sytuacja dotyczy streptogramin. Przez wiele lat, wirginamycynę, antybiotyk z tej grupy, stosowano jako stymulator wzrostu zwierząt. Przypuszcza się, że wywołało to powstanie oporności krzyżowej na inny antybiotyk z grupy streptogramin, chinuprystynę/dalfoprystynę (HWANG i współaut. 2010). W 1999 r. w krajach UE zabroniono podawania jej zwierzętom. Niestety nadal jest stosowana w celach terapeutycznych w Australii, a w Rosji i Chinach w sposób niekontrolowany w profilaktyce zwierząt oraz jako stymulator ich wzrostu. Oporność na chinuprystynę/dalfoprystynę stwierdzano najczęściej u szczepów izolowanych z produktów roślinnych i mięsnych. Potwierdzałoby to hipotezę o oporności krzyżowej u izolatów zwierzęcych. Badacze sugerują także, że oporność szczepów izolowanych z produktów roślinnych może być konsekwencją stosowania antybiotyków w hodowli bydła, trzody chlewnej lub drobiu. Pozostałości antybiotyków wydalane są przez zwierzęta razem z kałem do środowiska. Odchody zwierząt wciąż stosowane są przez farmerów bardzo często jako nawóz (obornik, gnojowica) (KWON 2011).

Oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów w środowisku szpitalnym uznawana jest za częstą przyczynę poważnych trudności w leczeniu infekcji enterokokowych. U izolatów z żywności stwierdzono różne poziomy oporności na aminoglikozydy, zależnie od źródła izolacji. CAMARGO i współaut. (2014) analizując sery, warzywa oraz surowy drób i wieprzowinę nie zaobserwowali oporności na wysokie stężenia gentamycyny, natomiast oporność na streptomycynę wykazywały jedynie izolaty z surowego mięsa i sta-

nowiły zaledwie 1,3% analizowanych szczepów. Podobne wyniki prezentował wcześniej FRACALANZZA i współaut. (2007) analizując szczepy z drobiu i mleka pasteryzowanego oraz JOHNSTON i JAYKUS (2004) badający izolaty z surowych warzyw. Z kolei TEUBER i współaut. (2009) stwierdzili fenotyp HLAR aż u 80% *Enterococcus* spp. izolowanych z serów. Natomiast GOMES i współaut. (2008) analizując izolaty z serów i mięsa surowego stwierdzili obecność fenotypu HLSR u 22% izolatów. Oporność szczepów z rodzaju *Enterococcus* o fenotypie HLGR najczęściej utożsamiana jest przez badaczy ze stwierdzeniem jedynie obecności genu *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Natomiast oporność na wysokie stężenia streptomycyny najczęściej bywa wynikiem działania enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy Ant(6'). Ponadto, gen ten często występuje w kombinacji z genem *aph(3'')-IIIa*, kodującym oporność na niskie stężenia kanamycyny, lub genem *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, kodującym oporność na wysokie stężenia gentamycyny. Pojawienie się szczepów o takim genotypie w żywności, z którą trafiają do organizmu człowieka, może skutkować stworzeniem niebezpiecznej koncentracji tych genów w organizmie. Z klinicznego punktu widzenia, taki stan rzeczy jest sygnałem niepokojącym, chociażby z racji konieczności wykluczenia stosowania terapii skojarzonej z β -laktamami, która wówczas nie daje efektu bakteriobójczego. U izolatów należących do gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* oznaczano także obecność genu *ant(4'')-Ia*, który jest bardzo często stwierdzany u opornych szczepów *Staphylococcus aureus* (DURAN i współaut. 2012). Potwierdza to możliwość wymiany materiału genetycznego między tymi dwoma rodzajami.

Istniejące nieliczne doniesienia na temat oporności paciorkowców *Enterococcus* spp. izolowanych z produktów roślinnych wskazują, że większość z nich jest oporna na aminoglikozydy, natomiast bardzo rzadko lub w ogóle nie obserwowano oporności na wankomycynę (MÜLLER i współaut. 2001). Ponadto, mimo że u izolatów z żywności pochodzenia roślinnego najczęściej oznacza się gatunek *E. casseliflavus*, to jednak częściej odporne na antybiotyki bywają szczepy należące do gatunków *E. faecium* i *E. faecalis* (MCGOWAN i współaut. 2006). Badania, którym poddano enterokoki wyizolowane ze świeżych warzyw (JOHNSTON i JAYKUS 2004) wykazały ponadto, że szczepy *E. faecium* znacznie częściej są odporne na antybiotyki niż *E. faecalis*. Izolaty te częściej wykazują oporność na tigeocyklinę, rifampicynę, fosfomycynę i erytromycynę niż izolaty należące do gatunku *E. faecalis*. Badania wskazują również, że izolaty z produktów roślinnych rzadziej wykazują opor-

ność na antybiotyki niż izolaty z produktów zwierzęcych (KOLUMAN i współaut. 2009). Niemniej jednak autorzy podkreślają, że spożywane na surowo produkty roślinne mogą stanowić istotne źródło w przenoszeniu genów oporności na antybiotyki do mikroflory przewodu pokarmowego.

Wiedza na temat antybiotykooporności szczepów izolowanych z żywności należących do gatunków innych niż *E. faecalis* i *E. faecium* pozostaje bardzo ograniczona. Niemniej jednak w pojawiających się nielicznych opracowaniach autorzy podkreślają, że szczepy należące do gatunków *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* i *E. gallinarum* również mogą stanowić źródło genów kodujących oporność na kilka istotnych klas antybiotyków (FRACALANZZA i współaut. 2007, CHAJECKA-WIERZCHOWSKA i współaut. 2016).

Uwagę zwraca także podobieństwo profili oporności u szczepów z materiału klinicznego i szczepów z żywności. Izolaty z obu źródeł najczęściej wykazują oporność na streptomycynę, erytromycynę, tetracyklinę i rifampicynę. Wśród izolatów klinicznych notuje się wyższy odsetek szczepów fenotypowo opornych i dlatego w tej grupie częściej stwierdzana się również obecność genów kodujących oporność na poszczególne grupy antybiotyków.

Obserwacje dotyczące antybiotykooporności paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z żywności pozwalają stwierdzić, że może ona być istotnym źródłem opornych i wieloopornych ziarniaków z tego rodzaju. Bakterie te często są nośnikami genów oporności i czynników wirulencji, które mogą łatwo przekazywać innym gatunkom, a nawet rodzajom. Co prawda ziarniaki izolowane z żywności charakteryzują się mniejszą antybiotykoopornością w porównaniu do opisywanych w literaturze szczepów klinicznych, niemniej jednak izolaty z obydwu tych środowisk są odporne na te same grupy antybiotyków. Niepokojący jest również fakt ciągłego wzrastania odsetka szczepów opornych izolowanych z żywności, w tym gotowej do bezpośredniego spożycia. Przewód pokarmowy jest środowiskiem o dużej gęstości populacji bakteryjnych, co niewątpliwie sprzyja wymianie materiału genetycznego między drobnoustrojami. W takich warunkach może zachodzić horyzontalny transfer genów na transpozonach i plazmidach koniugacyjnych (HAUG i współaut. 2011). Badania przeprowadzone przez NOVAIS i współaut. (2006) wykazały, że osoby zdrowe są często kolonizowane przez odporne na antybiotyki paciorkowce z rodzaju *Enterococcus*. Selekcja tych bakterii przez czynniki inne niż antybiotyki i możliwość transmisji szczepów opornych/genów oporności poprzez żywność może być

istotnym czynnikiem w rozprzestrzenianiu antybiotykooporności bakterii poza środowiskiem szpitalnym (HAUG i współaut. 2011).

Problem antybiotykooporności jest problemem globalnym, a żywność może być rezerwuarem opornych ziarniaków posiadających geny determinujące oporność rozprzestrzeniającą się horyzontalnie.

Streszczenie

W ostatnich latach obserwowany jest w otoczeniu człowieka systematyczny wzrost liczby szczepów antybiotykoopornych. Przez długi czas zjawisko antybiotykooporności wiązano jedynie ze środowiskiem szpitalnym. Jednakże badania wykazały m.in., że także żywność może być jednym ze źródeł rozprzestrzeniania szczepów opornych na antybiotyki. Zdolność paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* do przeżywania szeregu niekorzystnych warunków powoduje, że są one obecne w niemal każdym rodzaju żywności. Celem niniejszego przeglądu było opisanie mechanizmów oporności u enterokoków, roli mobilnych elementów genetycznych w jej rozprzestrzenianiu oraz scharakteryzowanie antybiotykooporności u enterokoków izolowanych z żywności w tym żywności gotowej do spożycia.

LITERATURA

- BARBOSA J., FERREIRA V., TEIXEIRA P., 2009. *Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products*. Food Microbiol. 26, 527-532.
- BEA-VEN CH., FU-YIN H., HUNG-YU L., 2014. *Bio-degradation of three tetracyclines in swine wastewater*. J. Environ. Sci. Health B 49, 449-455.
- BOYD D. A., WILLEY B. M., FAWCETT D., GILLANI N., MULVEY M. R., 2008. *Molecular characterization of Enterococcus faecalis N06-0364 with low-level ancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 2667-26672.
- CAI Y., KONG F., AND GILBERT G. L., 2007. *Three new macrolide efflux (mef) gene variants in Streptococcus agalactiae*. J. Clin. Microbiol. 45, 2754-2755.
- CAMARGO C. H., BRUDER-NASCIMENTO A., LEE S. H., JÚNIOR A. F., KANENO R., MORES RALL V., R., 2014. *Prevalence and phenotypic characterization of Enterococcus spp. isolated from food in Brazil*. Braz. J. Microbiol. 45, 111-115.
- CHAJECKA-WIERZCHOWSKA W., ZADERNOWSKA A., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM L., 2016. *Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in Enterococcus spp. isolated from retail shrimps*. LWT Food Sci. Technol. 69, 117-122.
- CHOI J. M., WOO G. J., 2014. *Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne Enterococcus faecalis*. Cur. Microbiol. 70, 476-484.
- CHOW J. W., 2000. *Aminoglycoside resistance in enterococci*. Clin. Infect. Dis. 31, 586-589.
- CLEWELL D. B., FRANCA M. V., FLANNAGAN S. E. AN F. Y., 2002. *Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the Staphylococcus aureus issue*. Plasmid 48, 193-201.
- COLLIGNON P., POWERS J. H., CHILLER T. M., AIDARA-KANE A., AARESTRUP F. M., 2009. *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. 49, 132-141.
- COURVALIN P., 2005. *Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens*. Int. J. Med. Microbiol. 294, 479-486.
- DEL GROSSO M., NORTHWOOD J. G. E., FARRELL D. J., PANTOSTI A., 2007. *The macrolide resistance genes erm(B) and mef(E) are carried by Tn2010 in dualgene Streptococcus pneumoniae isolates belonging to clonal complex CC271*. Antimicrob. Agents Chemioth. 50, 4184-4186.
- DELPECH G., POURCEL G., SCHELL C., DE LUCA M., BASUALDO J., BERNSTEIN J., GRENOVERO S., SPARO M., 2012. *Antimicrobial resistance profiles of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from artisanal food of animal origin in Argentina*. Foodborne Pathog. Dis. 9, 939-944.
- DEPARDIEU F., KOLBERT M., PRUUL H., BELL J., COURVALIN P., 2004. *VanD-type vancomycin resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemioth. 48, 3892-3904.
- DING C., HE. J., 2010. *Effect of antibiotics in the environment on microbial populations*. Appl. Microbiol. Biot. 87, 925-941.
- DING Z. F., ZHANG H., TANG W., TONG C. Y., LI R.T., CHEN L.X., PU L. J., ZHU Z. B., CUI Y. D., 2012. *Methylase genes-mediated erythromycin resistance in Staphylococcus aureus from bovine mastitis in China*. Israel J. Vet. Med. 67, 170-179.
- DURAN N., BURCIN O., DURAN G. G., ONLEN Y., DEIR C., 2012. *Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci*. Indian J. Med. Res. 135, 389-396.
- DUTTA I., REYNOLDS P. E., 2002. *Biochemical and genetic characterization of the vanC-2 vancomycin resistance gene cluster of Enterococcus casseliflavus ATCC 25788*. Antimicrob. Agents Chemioth. 46, 3125-3132.
- FOULQUIÉ MORENO M. R., SARANTINOPOULOS P., TSAKALIDOU E., DE VUYST L., 2006. *The role and application of enterococci in food and health*. Int. J. Food Microbiol. 106, 1-24.
- FRACALANZZA S. S., SCHEIDEGGER E., SANTOS P., LEITA P., TEIZEIRA L., 2007. *Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Reo de Janeiro*. Mem. I. Oswaldo Cruz. 102, 853-859.
- GAZZOLA S., FONTANA C., BASSI D., COCCONCELLI P. S., 2012. *Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and -independent methods*. Food Microbiol. 30, 348-354.
- GELSOMINO R., VANCANNEYT M., COGAN T. M., SWINGS J., 2003. *Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces*. Appl. Environ. Microb. 69, 312-319.
- GHOLIZADEH Y., COURVALIN P., 2000. *Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci*. Int. J. Antimicrob. Agents 16 (Supl. 1), S11-S17.
- GIRAFFA G., 2002. *Enterococci from foods*. FEMS Microbiol. Rev. 26, 163-171.
- GOMES B. C., ESTEVES C. T., PALAZZO I. C. V., DARINI A. L. C., FELIS G. E., SECHI L. A., FRANCO B. D. G. M., DE MARTINIS E. C. P., 2008. *Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods*. Food Microbiol. 25, 668-675.

- HAMMERUM A. M., 2012. *Enterococci of animal origin and their significance for public health*. Clin. Microbiol. Infect. 18, 619-625.
- HAUG M. C., TANNER S. A., LACROIX C., STEVENS M. J. A., MEILE L., 2011. *Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model*. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 210-219.
- HENRY X., AMOROSO A., COYETTE J., JORIS B., 2010. *Interaction of ceftibiprole with the low-affinity PBP 5 of Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemioth. 54, 953-955.
- HOLLENBECK B.L., RICE L.B., 2012. *Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus*. Virulence. 3, 421-569.
- HUMMEL A., HOLZAPFEL W. H., FRANZ C. M. A. P., 2007. *Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food*. Sys. Appl. Microbiol. 30, 1-7.
- HWANG I. Y., KU H. O., LIM S. K., LEE K. J., PARK C. K., JUNG G. S., JUNG S. C., PARK Y. H., NAM H. M., 2010. *Distribution of streptogramin resistance genes and genetic relatedness among quinupristin/dalfopristin-resistant Enterococcus faecium recovered from pigs and chickens in Korea*. Res. Vet. Sci. 89, 1-4.
- JENSEN L. B., GARCIA-MIGURA L., VALENZUELA A. J. S., LØHR M., HASMAN H., AARESTRUP F. M., 2010. *A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria*. J. Microbiol. Meth. 80, 25-43.
- JOHNSTON L., JAYKUS L., 2004. *Antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from produce*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3133-3137.
- KOLUMAN A., AKAN L.S., CAKIROGLU F. P., 2009. *Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods*. Food Control 20, 281-283.
- KÜMMERER K., 2009. *Antibiotics in the aquatic environment. A review. Part II*. Chemosphere. 75, 435-441.
- KWON J.W., 2011. *Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost*. B. Environ. Contam. Tox. 87, 40-44.
- LASCOLS C., LEGRAND P., MÉRENS A., LECLERCQ R., MULLER-SERIEYS C., DRUGÉON H. B., KITZIS M. D., REVERDY M. E., ROUSSEL-DELVALLEZ M., MOUBARECK C., BRÉMONT S., MIARA A., GJOKLAJ M., SOUSSY C. J., 2011. *In vitro antibacterial activity of ceftibiprole against clinical isolates from French teaching hospitals: proposition of zone diameter breakpoints*. Int. J. Antimicrob. Ag. 37, 235-239.
- LEAVIS H. L., WILLEMS R. J., VAN WAMEL W. J., SCHUREN F. H., CASPERS M. P., BONTEN M. J., 2007. *Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of E. faecium*. PLoS Pathog. 3, e7.
- LEBRETON F., DEPARDIEU F., BOURDON N., FINES-GUYON M., BERGER P., CAMIADE S., LECLERCQ R., COURVALIN P., CATTOIR V., 2011. *D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemioth. 55, 4606-4612.
- LI X.-Z., NIKAIIDO H., 2009. *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. Drugs 69, 1555-1623.
- MANNU L., PABA A., DAGA E., COMUNIAN R., ZANETTI S., DUPRE I., SECHI L. A., 2003. *Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin*. Int. J. Food Microbiol. 88, 291-304.
- MARTINEZ J. L., 2009. *Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants*. Environ. Pollut. 157, 2893-2902.
- MCGOWAN L. L., JACKSON C. R., BARRETT J. B., HIOTT L. M., FEDORKA-CRAY P. J., 2006. *Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats*. J. Food Prot. 69, 2976-2982.
- MCKESSAR S. J., BERRY A. M., BELL J. M., TURNIDGE J. D., PATON J. C., 2000. *Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemioth. 44, 3224-3228.
- MÜLLER T., ULRICH A., OTT E. M., MÜLLER M., 2001. *Identification of plant-associated enterococci*. J. Appl. Microbiol. 91, 268-278.
- NORMAN A., HANSEN L. H., SORENSEN S. J., 2009. *Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool*. Philos. T. Roy. Soc. B. 364, 2275-2289.
- NOVAIS C., COQUE T. M., SOUSA J. C., PEIXE L. V., 2006. *Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal*. Clin. Microbiol. Inf. 12, 1131-1134.
- PALMIERI C., MINGOIA M., MASSIDDA O., GIOVANETTI E., VARALDO P. E., 2012. *Streptococcus pneumoniae transposon Tn1545/Tn6003 changes to Tn6002 due to spontaneous excision in circular form of the erm(B)- and aphA3-containing macrolide-aminoglycoside-streptothricin (MAS) element*. Antimicrob. Agents Chemioth. 56, 5994-5997.
- PESAVENTO G., CALONICO C., DUCCI B., MAGNANINI A., LO NOSTRO A., 2014. *Prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat*. Food Microbiol. 41, 1-7.
- PORTILLO A., RUIZ-LARREA F., ZARAZAGA M., ALONSO A., MARTINEZ J. L. TORRES C., 2000. *Macrolide resistance genes in Enterococcus spp.* Antimicrob. Agents Chemioth. 44, 967-971.
- REIJTMAN V., GAGETTI P., FACCONI D., FOSSATI S., SOMMERFLECK P., HERNÁNDEZ C., BERNÁLDEZ P., LOPARDO H., CORSO A., 2013. *Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media*. Rev. Argentina Microbiol. 45, 262-266.
- REINERT R. R., 2009. *The antimicrobial resistance profile of Streptococcus pneumoniae*. Clin. Microbiol. Inf. 15 Suppl 3, 7-11.
- RICE L. B., 1998. *Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants*. Antimicrob. Agents Chemioth. 42, 1871-1877.
- RICE L. B., BELLAIS S., CARIAS L. L., HUTTON-THOMAS R., BONOMO R. A., CASPERS P., PAGE M. G. P., GUTMANN L., 2004. *Impact of Specific pbp5 Mutations on Expression of β -Lactam Resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemioth. 48, 3028-3032.
- ROBERTS M. C., 2005. *Update on acquired tetracycline resistance genes*. FEMS Microbiol. Lett. 245, 195-203.
- ROBERTS M. C., 2008. *Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes*. FEMS Microbiol. Lett. 282, 147-159.
- ROBERTS M. C., 2011. *Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria*. Front. Microbiol. 2, 1-8.
- SERGELIDIS D., ABRAHIM A., PAPADOPOULOS T., KIRKLOUDIS J., ANAGNOSTOU V., PAPAVERGOU A., PAPA A., 2013. *Antimicrobial susceptibility of Enterococcus spp. isolated from freshwater fish and personnel and equipment of fish mar-*

- kets in northern Greece. J. Hellenic Vet. Med. Soc. 64, 239-248.
- TEUBER M., MEILE L., SCHWARZ F., 2009. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76, 115-137.
- THUMU S. C. R., HALAMI P. M., 2012. Acquired resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics in lactic acid bacteria of food origin. *Indian J. Microbiol.* 52, 530-537.
- TREMBLAY C. L., LETELLIER A., QUESSY S., BOULIANNE M., DAIGNAULT D., ARCHAMBAULT M., 2011. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes. *J. Food Prot.* 74, 1639-1648.
- TREMBLAY C.L., LETELLIER A., QUESSY S., DAIGNAULT D., ARCHAMBAULT M., 2012. Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of *tet(M)* and *erm(B)* genes. *J. Food Prot.* 75, 1595-1602.
- VAN DEN BERGHE E., DE WINTER T., DE VUYST L., 2006. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 159-170.
- WERNER G., 2012. Surveillance of antimicrobial resistance among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from human (clinical/commensal), food/animal, meat and environmental samples. [W:] *Enterococcus and safety*. SEMEDO-LEMSADDEK T., BARRETO-CRESPO M.T., TENREIRO R. (red.). NovaScience Publishers Inc., Hauppauge, New York, 155-198.
- WOODFORD N., 2005. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Inf.* 11 (Suppl. 3), 2-21.
- XU X., LIN D., YAN G., YE X., WU S., GUO Y., ZHU D., HU F., ZHANG Y., WANG F., JACOBY G. A., WANG M., 2010. *VanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Ch.* 54, 4643-4647.
- ZMANTAR T., KOUIDHI B., MILADI H., BAKHROUF A., 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes*. 4, 453.
- ZOU L. K., WANG H. N., ZENG B., LI J. N., LI X. T., ZHANG A. Y., ZHOU Y. S., YANG X., XU C. W., XIA Q. Q., 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol.* 34, 73-80.

KOSMOS Vol. 66, 1, 67-79, 2017

WIOLETA CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, ANNA ZADERNOWSKA, LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

Chair of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Cieszyński 1, 10-719 Olsztyn,
E-mail: wioleta.chajECKa@uwm.edu.pl

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ENTEROCOCCUS* STRAINS PRESENT IN FOOD

Summary

The number of antibiotic resistant bacterial strains found in the human environment has been growing in recent years. Antibiotic resistance has long been linked exclusively with the hospital environment. However, according to the findings of various studies, food can also be a source of antibiotic resistant strains. The ability of *Enterococcus* species to survive in a broad range of adverse environments causes that these bacteria are present in nearly all kinds of food. In this review we aimed to summarize mechanisms of antibiotic resistance in enterococci, the role of mobile genetic elements played in spreading of the resistance and to characterize antibiotic resistance among enterococci from food, inclusive of ready-to-eat food.