

Czynniki wirulencji, lekooporność i grupy filogenetyczne uropatogennych *Escherichia coli* izolowanych od psów i kotów



Jolanta Kutkowska¹, Katarzyna Gorzkiewicz¹, Karolina Wrześniewska²



¹Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin;

²Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

WPROWADZENIE

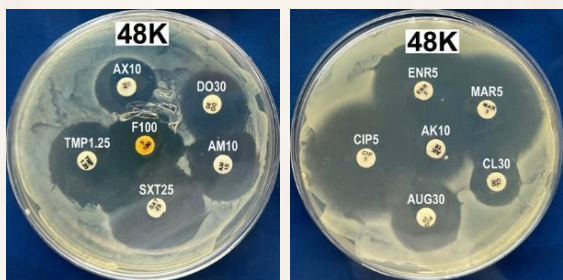
Uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (UPEC) stanowią główną przyczynę zakażeń układu moczowego (ZUM). Ich zdolność do skutecznej kolonizacji pęcherza moczowego opiera się na obecności licznych czynników wirulencji, które umożliwiają przyleganie do nabłonka urotelialnego, unikanie mechanizmów obronnych gospodarza oraz pozyskiwanie niezbędnych składników odżywczych, zwłaszcza żelaza. Wśród kluczowych struktur powierzchniowych UPEC wyróżnia się lipopolisacharyd (LPS), otoczkę polisacharydową, fimbrie, rzęski, białka curli, pęcherzyki błony zewnętrznej (OMVs), a także adhezyny niezwiązane z fimbrami i białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins, OMPs). Elementy te odgrywają zasadniczą rolę w inicjalnej adhezji do komórek urotelium oraz w tworzeniu biofilmu. UPEC dysponują również systemami sekrecyjnymi do wydzielania toksyn, takich jak hemolizyna i toksyna nekrotyzująca (CNF), które uszkadzają komórki gospodarza i wspomagają rozprzestrzenianie się infekcji. Niezwykle istotne są także mechanizmy wychwytu żelaza z otoczenia, w tym receptory sideroforowe zależne od kompleksu TonB, umożliwiające skuteczne pozyskiwanie tego pierwiastka w warunkach jego ograniczonej dostępności w środowisku zakażenia. Skoordynowane działanie tych czynników umożliwia UPEC nie tylko przetrwanie w drogach moczowych, lecz również skuteczne wywoływanie ostrych i nawrotowych zakażeń, co stanowi istotne wyzwanie kliniczne i terapeutyczne.

Celem pracy było określenie profili oporności na antybiotyki, grup filogenetycznych oraz genów kodujących czynniki wirulencji szczepów *E. coli* wyizolowanych od psów i kotów z zakażeniem dróg moczowych.

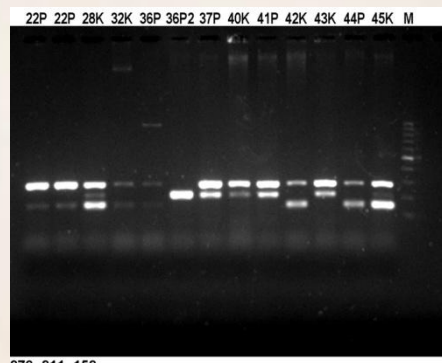
METODY

- Metoda dyfuzyjno-krażkowa polega na naniesieniu zawiesiny bakteryjnej o gęstości 0,5 McFarlanda na podłoże Mueller-Hinton i rozmieszczeniu na nim krajków z antybiotykami. Po inkubacji przez 18 godzin w 37°C mierzy się strefy zahamowania wzrostu i porównuje z normami CLSI lub EUCAST, klasyfikując szczepy jako wrażliwe, średnio wrażliwe lub odporne.
- Określenie grup filogenetycznych oraz obecność genów związanych z wirulencją przeprowadzono na podstawie wyników reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów. Produkty amplifikacji o określonej długości rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym i wizualizowano w świetle UV.
- Biofilmy, będące ważnym czynnikiem wirulencji, umożliwiają bakteriom przyleganie do powierzchni i zwiększają ich odporność na leczenie. Ich tworzenie oceniano metodą barwienia fioletem krystalicznym po 24–48 godzinnej inkubacji hodowli w płytkach 96-dołkowych, a ilość biofilmu określano na podstawie pomiaru absorbancji przy 570 nm.

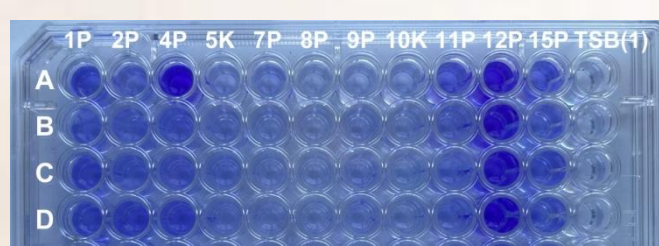
WYNIKI



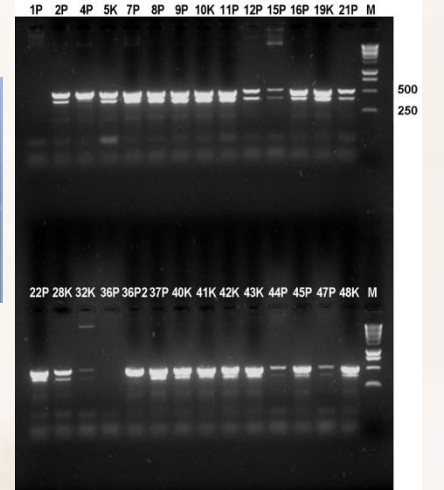
Fot. 1. Określenie wrażliwości na antybiotyki badanych izolatów metodą dyfuzyjno-krażkową



Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z zastosowaniem primerów: chuA-F, chuA-R, yjaA-F, yjaA-R, TSPE4.C2-F, TSPE4.C2-R (M – marker)



Fot. 3. Tworzenie biofilmu wybranych izolatów



Fot. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z zastosowaniem primerów irp2 (413 pz) i iroN (500 pz), M – marker

- Największą oporność zaobserwowano wobec antybiotyków β -laktamowych, natomiast najniższą w przypadku fluorochinolonów. Wysoki poziom oporności stwierdzono także wśród aminoglikozydów, tetracyklin i sulfonamidów. Do grupy szczepów wielolekoopornych (MDR) zakwalifikowano 30% izolatów. Cztery szczepy produkowały cefalosporynazy AmpC, z czego jeden jednocześnie wytwarzał β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL).
- Wśród izolatów *E. coli* przeważały filogrupy D oraz B2, natomiast filogrupę A (szczepy komensalne) stwierdzono jedynie u 4 izolatów, z których 2 wykazywały wielolekooporność.
- U większości szczepów (85–96%) wykryto obecność genów curli (*csgA*) oraz systemów pobierania żelaza (*iroN*, *irp2*), natomiast geny kodujące pile typu P (*papC*) wykryto u 55% izolatów. Geny związane z syntezą celulozy (*bcs*) i flageliną (*fliC*) występowały jedynie u mniej niż 20% szczepów.
- Spośród badanych szczepów, 12 nie tworzyło biofilmu, 9 tworzyło biofilm słaby, 6 umiarkowany, a 9 silny. Większość szczepów wykazywała więc zdolność do tworzenia biofilmu, co może świadczyć o ich potencjalnej wirulencji i oporności na leczenie.

PODSUMOWANIE

Nadmierne i niewłaściwe stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych prowadzi do selekcji szczepów bakterii opornych, które z czasem zaczynają dominować w populacji. Gram-ujemne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp., wykazują szczególną zdolność do rozwijania wielolekooporności. Komensalne szczepy *E. coli*, bytujące w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, stanowią istotny rezerwuár genów oporności (AMR), które mogą być przekazywane patogenom. Narastająca oporność na antybiotyki, w tym na leki ostatniej szansy, jak karbapenemy i polimyksyny, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego i weterynaryjnego. Konieczne są skoordynowane działania w zakresie monitoringu, kontroli stosowania antybiotyków oraz rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

Bibliografia:

- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555–4558.
- Facchin, A., Filipe, J., Mauri, I., Tagliasacchi, F., Grilli, G., Vitiello, T., ... & Lauzi, S. (2025). Antimicrobial Resistance and Biofilm-Forming Ability in ESBL-Producing and Non-ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Canine Urinary Samples from Italy. *Antibiotics*, 14(1), 31.
- Zalewska-Piątek, B., Piątek, R., Krawczyk, B., & Olszewski, M. (2019). Patomechanizm zakażeń dróg moczowych wywołanych przez uropatogenne szczepy *E. coli*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73, 269–281.
- Kim, D., Kim, S., Kwon, Y., Kim, Y., Park, H., Kwak, K., ... & Kang, L. W. (2023). Structural insights for β -lactam antibiotics. *Biomolecules & Therapeutics*, 31(2), 141.
- Golik, P. (2023). *Analiza strukturalna i biochemiczna bakteryjnych czynników wirulencji* (Doctoral dissertation).

