

# Ocena występowania plazmidowych genów zjadliwości spv oraz antybiotykooporność szczepów *Salmonella* izolowanych z mleka

AGNIESZKA WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, BARBARA ZDRODOWSKA,  
BEATA WYSOK, JOANNA SZTEYN, KATARZYNA LIEDTKE,  
MAŁGORZATA GOMÓŁKA-PAWLICKA, JOANNA WOJTACKA

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 28.03.2017

Zaakceptowano 05.06.2017

Wiszniewska-Łaszczych A., Zdrodowska B., Wysok B., Szteyn J.,  
Liedtke K., Gomółka-Pawlicka M., Wojtacka J.

## Determination of the occurrence of plasmid virulence genes (spv) and antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from raw milk

### Summary

The aim of the study was to measure the frequency of occurrence of *Salmonella* spp. in raw milk, to identify their serotype, as well as to determine their antibiotic resistance and the presence of *Salmonella* plasmid virulence (spv) genes. Out of 300 bulk tank milk samples, 5.3% were contaminated with *Salmonella* spp. All strains isolated belonged to the serovar *S. enteritidis*, as confirmed by serotyping and molecular methods. The presence of spv genes was determined by PCR. Spv genes were present, in different patterns, in all strains tested. SpvA gene was present in all isolates (100%), spvB in 56.25%, spvC in 62.5%, spvD in 75%, and spvR in 56.25%. Antibiotic resistance was evaluated according to the NCCLS recommendations. All isolates were sensitive to ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GE), and chloramphenicol (CH). Thirteen strains were resistant to ampicillin (AMP), 8 to erythromycin (E), 1 to doxycycline (DO), and 1 to tetracycline (TE). Different frequency of occurrence of the spv genes in *Salmonella* strains isolated from raw milk demonstrates their high adaptability. As many as 87.5% of isolates showed resistance to at least one of the antibiotics tested.

**Keywords:** *Salmonella* spp., raw milk, spv genes, antibiotic resistance

Pałeczki *Salmonella* są w dalszym ciągu jedną z głównych przyczyn zakażeń i zatruc pokarmowych pochodzenia bakteryjnego. Jak wynika z najnowszego raportu Europejskiego Urzędu do Spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), w 2015 r. odnotowano w Europie 94 625 przypadków zachorowań ludzi w wyniku zakażenia salmonellą, co stanowiło 27,6% wszystkich potwierdzonych przypadków zoonoz i wskazuje na 1,9% wzrost zachorowalności w porównaniu z 2014 r. Źródłem zakażenia jest zanieczyszczona pałeczkami *Salmonella* żywność pochodzenia zwierzęcego. Statystycznie, najwyższa liczba zachorowań jest wynikiem spożycia jaj i produktów jajecznych, a także wyrobów cukierniczych zawierających surowe jaja. Źródłem zakażenia człowieka może być również niepoddane obróbce termicznej mleko i produkty wytwarzane z mleka surowego (4, 6, 10, 19). W Polsce, w związku z istniejącą sprzedażą

bezpośrednią i możliwą obecnie sprzedażą produktów wytwarzanych z mleka surowego w ramach rolniczego handlu detalicznego, zwiększa się ryzyko narażenia konsumenta na kontakt z patogenem.

Salmonelloza ludzi może przebiegać w postaci schorzeń jelitowych, ostrych zatruc pokarmowych lub nieżyty żołądkowo-jelitowego. Epizodycznie notowane są postaci pozajelitowe: posocznica oraz salmonellozy narządowe (18). Na zdolność wywołania ogólnoustrojowej bakteriemii przez bakterie z rodzaju *Salmonella* mają wpływ białka spv (*salmonella* plasmid virulence), których geny znajdują się na odcinku plazmidu o wielkości 7,8 kbp. Opisywanych zostało 5 typów białka spv: R, A, B, C i D. Zwiększają one w znacznym stopniu zdolność pałeczek *Salmonella* do wewnątrzkomórkowego namnażania podczas pozajelitowej fazy choroby (9, 22), a także umożliwiają wzrost w makrofagach (15, 16). Poprzez ukierunkowaną ich ekspresję *Sal-*

*monella* może ograniczyć namnażanie i przetrwać w komórkach gospodarza przez dłuższy czas czyniąc go nosicielem. Wykryto je niemal we wszystkich serowarach *Salmonella* izolowanych od zwierząt (*S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum-Pullorum* czy *S. Abortusovis*), nie występują natomiast w *S. Typhi*. W serowarach występujących zarówno u zwierząt, jak i ludzi (*S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*) białka spv obecne są w różnych proporcjach i konfiguracji (3).

Szybka adaptacja pałeczek *Salmonella* do reakcji obronnej organizmu gospodarza powoduje powszechne występowanie tego patogenu u zwierząt, a w konsekwencji konieczność użycia antybiotyków do ograniczenia infekcji. Powszechne w ostatnich latach stosowanie terapii powoduje narastanie oporności drobnoustrojów na coraz większą liczbę chemioterapeutyków, co zwiększa trudności w leczeniu zatruc i zakażeń wywołanych przez tę grupę bakterii (5).

Celem badań było:

- określenie częstotliwości występowania pałeczek z rodzaju *Salmonella* w mleku zbiorczym z gospodarstw produkcyjnych,
- określenie serotypów izolatów pałeczek z rodzaju *Salmonella* występujących w mleku,
- wykrycie obecności genów spv w plazmidowym DNA wyizolowanych szczepów,
- ocena wrażliwości wyizolowanych szczepów *Salmonella* na wybrane antybiotyki.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 300 próbek mleka zbiorczego, pochodzącego z gospodarstw produkcyjnych na terenie środkowej i wschodniej Polski. Próbkę pobierane były zgodnie z PN-A-86040:1998 „Mleko surowe do skupu. Pobieranie próbek.” przez przeszkolonych próbobiorców, do sterylnych pojemników i transportowane w warunkach chłodniczych do Katedry Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia

Tab. 1. Sekwencje nukleotydowe starterów użytych do wykrywania genów *sdfI* i plazmidowego zgrupowania *spv*

Gen	Starter	Sekwencja 5'→3'	Wielkość produktu [bp]	T <sub>A</sub> [°C]	Piśmiennictwo
SdfI	ENTF	GTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	304	57	Haneda i wsp. (8)
	ENTR	TGAACTACGTTCCG			
spvR	Spv R1	AAAAAGGTCACCGCCATCCTG	967	58	
	Spv R2	CAGAAGGTGGACTGTTTCAGTTC			
spvA	Spv A1	CCTGCAGACATTATCAGTCTTCAGG	832	58	
	Spv A2	AAGCTAACTGCCGGCTGGCAC			
spvB	Spv B1	CCGTTAGAGCAGACGCTGTAAGC	1856	59	
	Spv B2	GTATCTATGAGTTGAGTACCCCTATG			
spvC	Spv C1	CGCAAAGTAGTGTCTATCAAAC	919	56	
	Spv C2	CCATACTACTCTGTCTATCAAACG			
spvD	Spv D1	GGTGAAAATTACATAAGCAAGAGC	738	57	
	Spv D2	TATCACTCGTGTTCATCATAAGC			

Objaśnienia: T<sub>A</sub> [°C] – temperatura wiązania starterów

Publicznego w Olsztynie, gdzie poddawane były procedurze wykrywania pałeczek *Salmonella*.

**Izolacja pałeczek *Salmonella* z mleka.** Próbkę o objętości 25 ml poddano procedurze opisanej w Normie PN-EN ISO 6785 2007 (Mleko i przetwory mleczne – Wykrywanie *Salmonella* spp.). Kolonie o morfologii typowej dla bakterii z rodzaju *Salmonella*, wyrosłe na selektywnie namnażających podłożach stałych traktowano jako podejrzane o przynależność do rodzaju. Wybrane kolonie przesiewano na podłoże BHI (Brain Heart Infusion) w celu namnożenia, a po 18 h inkubacji przesiewano na podłoże stałe TSA (Trypton Soya Agar) w celu otrzymania pojedynczych kolonii. Czysty szczep bakteryjny przechowywany był zgodnie z zaleceniami Krajowego Ośrodka Salmonelli w Gdańsku, na skosie agaru odżywczego w temperaturze pokojowej, w warunkach ciemni.

**Określenie serotypów wyizolowanych szczepów bakteryjnych.** Wszystkie wyizolowane w poprzednim etapie badań szczepy zbadano na obecność antygeny rzęskowego (HM). Szczepy wykazujące dodatni odczyn w aglutynacji szkiełkowej przesłano do Zakładu Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, gdzie przeprowadzono pełną ich identyfikację serologiczną.

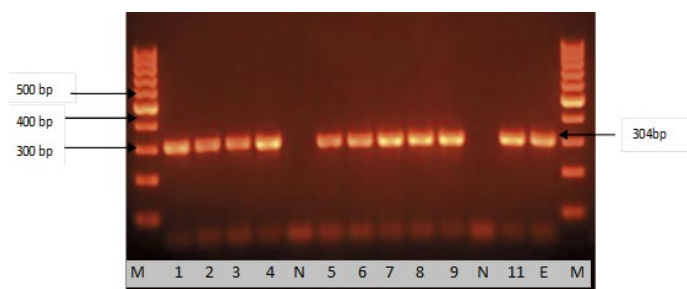
Przynależność szczepów do serotypu *S. Enteritidis* potwierdzono w reakcji amplifikacji fragmentu genu *Sdf I*. Izolację kwasu nukleinowego z 12-godzinnej hodowli bakteryjnej na pożywce TSB (Trypton Soya Broth) przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji DNA chromosomalnego firmy A&A Biotechnology (Polska), zgodnie z procedurą producenta. Uzyskany materiał genetyczny oczyszczano w kolumnie ze złożem krzemionkowym, po czym zawieszano w 200 µl buforu Tris (10 mM TRIS-HCl pH 8,5) i przechowywano w lodówce do czasu dalszych analiz.

PCR wykonano przy użyciu Start Warm 2x PCR MasterMix (A&A Biotechnology, Polska). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 12,5 µl 2x PCR MasterMix, 1 µl DNA matrycowego, po 2 µl 10 mM starterów (tab. 1), 9,5 µl wody wolnej od nukleaz. Denaturację wstępną przeprowadzono w temperaturze 94°C przez 2 min. Program amplifikacji składał się z 35 cykli obejmujących następujące etapy: denaturacja 94°C – 30 sek.; wiązania starterów 57°C – 30 sek.; wydłużania nici DNA 72°C – 30 sek. Końcowe wydłużania przeprowadzono w temp. 72°C – 10 min. Produkt amplifikacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym przy napięciu 60 V, natężeniu 400 mA w obecności wzorca wielkości Gene-Ruler™100bp DNA Ladder (Fermentes, Litwa).

**Określenie występowania genów *spv* w plazmidowym DNA wyizolowanych szczepów.** DNA dużych plazmidów zjadliwości, pałeczek *Salmonella* izolowano z 12-godzinnej hodowli bakteryjnej na pożywce TSB przy użyciu zestawu do izolacji megaplazmidów BAC-100 (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z procedurą producenta. Jakość i ilość wyizolowanego plazmidowego DNA oceniono w spektrofotometrze NanoVue (LifeTechnologies).

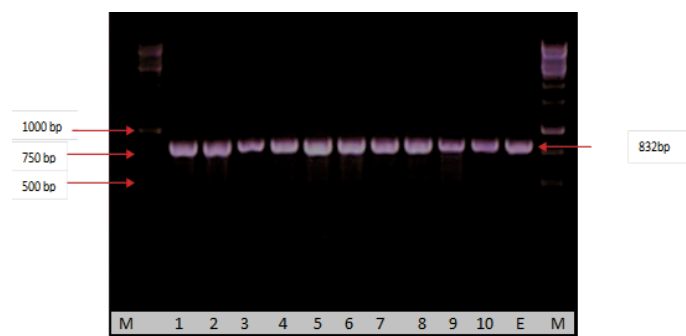
Obecność genów zgrupowania spv na dużym plazmidzie zjadliwości wykrywano metodą PCR. Reakcja wykonana została przy użyciu Start Warm 2x PCR MasterMix (A&A Biotechnology, Polska), która zawiera w swoim składzie hot-startową polimerazę DNA. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 12,5 µl 2x PCR MasterMix, 1 µl DNA matrycowego, po 2 µl 10 mM starterów (tab. 1) (8, 17), 9,5 µl wody wolnej od nukleaz. Wstępną denaturację przeprowadzano w temperaturze 94°C przez 2 min. Program amplifikacji składał się z 35 cykli złożonych z następujących

etapów: denaturacja DNA 94°C – 30 sek; wiązania starterów 56-61°C – 30 sek (w zależności od startera – tab. 1), wydłużanie nici DNA 72°C – 30 sek. Końcowe wydłużania przeprowadzano w temp. 72°C – 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym (ryc. 2-6) przy napięciu 60 V, natężeniu 400 mA, w obecności wzorca wielkości DNA GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentes, Litwa). Reakcję przeprowadzono w obecności kontroli pozytywnej – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.



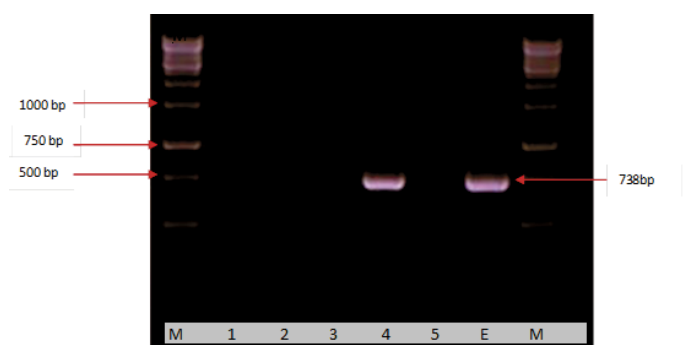
**Ryc 1. Elektroforegram produktów amplifikacji dla markera *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; M – marker wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; N – kontrola negatywna – *Salmonella* Infantis; E – kontrola pozytywna – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis



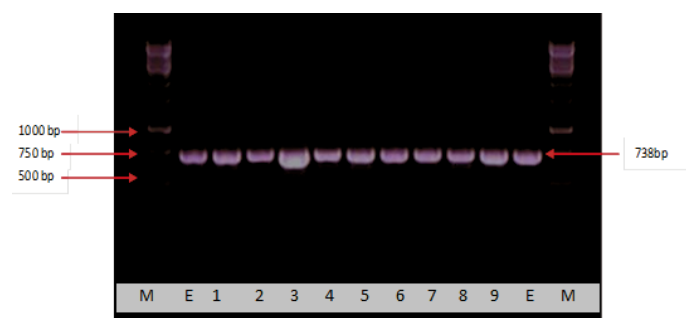
**Ryc. 2. Elektroforegram produktów amplifikacji genu spvA terenowych szczepów *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1-10 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; M – marker wielkości GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; E – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis



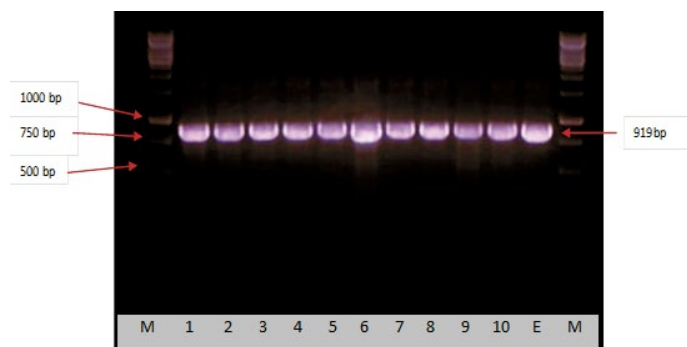
**Ryc. 3. Elektroforegram produktów amplifikacji genu spvD szczepów *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1-4 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; E – szczep referencyjny; M – marker wielkości GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder



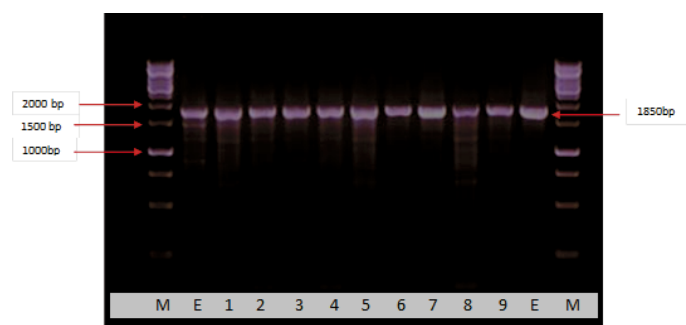
**Ryc. 4. Elektroforegram produktów amplifikacji genu spvD terenowych szczepów *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1-9 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; M – marker wielkości GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; E – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis



**Ryc. 5. Elektroforegram produktów amplifikacji genu spvC terenowych szczepów *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 15 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; M – marker wielkości GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; E – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis



**Ryc. 6. Elektroforegram produktów amplifikacji genu spvB terenowych szczepów *Salmonella* Enteritidis**

Objaśnienia: 1-9 – terenowe szczepy *Salmonella* Enteritidis; M – marker wielkości GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; E – referencyjny szczep *Salmonella* Enteritidis

**Ocena wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów.** Wszystkie wyizolowane szczepy należące do *Salmonella* Enteritidis poddane zostały badaniu w kierunku wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzji krążkowej, zgodnie z rekomendacją National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Pojedyncza kolonia badanego szczepu bakteryjnego posiewana była do podłoża BHI. Po 18 godzinach inkubacji hodowlę rozcieńczano w celu osiągnięcia gęstości 0,5 według skali McFarlanda, a następnie powtórnie rozcieńczano w proporcji 1 : 10 i posiewano powierzchniowo na podłoże Mueller-Hinton. Kolejnym etapem było nałożenie krążków nasączonych antybiotykiem: erytromycyna – E (15 µg), gentamycyna – GE (10 µg), ciprofloksacyna – CIP (5 µg), ampicilina – AMP (10 µg), tetracyklina – TE (30 µg), doksycyklina – DO (30 µg) i chloramfenikol – CH (30 µg). Posiewy inkubowano w temp. 37°C przez 22 ± 2 h. Strefy zahamowania wzrostu określane były zgodnie ze standardami NCCLS. Do kontroli oceny wrażliwości użyto szczepu wzorcowego: *Escherichia coli* ATCC 25922.

### Wyniki i omówienie

W posiewach wykonanych z 300 próbek mleka zbiorczego w 29 zaobserwowano wzrost kolonii o morfologii charakterystycznej dla bakterii z rodzaju *Salmonella*. Badanie serologiczne z surowicą HM potwierdziło przynależność 17 z wyizolowanych szczepów do *Salmonella* spp. W wyniku dalszej identyfikacji serologicznej przeprowadzonej w Zakładzie Mikrobiologii PIW-PIB w Puławach stwierdzono, że 16 z 29 przesłanych do badania szczepów bakteryjnych należy do *Salmonella* Enteritidis. Przynależność

**Tab. 2. Występowanie genów zgrupowania spv w plazmidach szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych z mleka**

Szczep nr	Gen				
	spvA	spvB	spvC	spvD	spvR
1	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	-
3	+	-	-	-	+
4	+	+	-	-	+
5	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	-
7	+	+	-	-	-
8	+	+	-	+	-
9	+	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+
11	+	-	+	-	+
12	+	-	-	+	+
13	+	-	+	+	-
14	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+
16	+	-	+	+	+

Objaśnienia: (+) – gen występuje; (-) – brak genu

serotypową potwierdzono w Katedrze Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego w reakcji PCR, amplifikując charakterystyczny fragment genu Sdf I.

W materiale genetycznym dużych plazmidów wszystkich badanych szczepów stwierdzono obecność sekwencji nukleotydowych charakterystycznych dla genów zgrupowania spv. Amplifikacja kwasu nukleinowego pozwoliła wykazać występowanie genu spvA we wszystkich 16 izolatach, natomiast pozostałe geny należące do badanej grupy występowały, odpowiednio: gen spvB w 9, gen spvC w 10, gen spvD w 12 i gen spvR w 9 izolatach. W 3 wyizolowanych z mleka szczepach *Salmonella* Enteritidis odnotowano występowanie wszystkich pięciu genów zgrupowania spv, co stanowi 18,75% izolatów. Cztery geny z grupy wykryto w 4 szczepach (25%), trzy w 7 szczepach (43,7%) i dwa w 2 szczepach (12,5%) (tab. 2).

Określając antybiotykooporność wyizolowanych szczepów *S. Enteritidis* stwierdzono, że tylko 2 izolaty wrażliwe były na wszystkie użyte w oznaczeniu antybiotyki. Jednocześnie wszystkie wyizolowane szczepy wykazywały wrażliwość na ciprofloksacynę (CIP), gentamycynę (GE) i chloramfenikol (CH). Oporność na ampicylinę (AMP) wykazało 13 szczepów, na erytromycynę (E) 8, a na doksycylinę (DO) i na tetracyklinę (TE) po jednym szczepie. Zjawisko wielooporności stwierdzono u 14 wyizolowanych z mleka szczepów (tab. 3).

Z przeprowadzonych badań wynika, że 5,3% próbek mleka pozyskanych na terenie środkowej i wschodniej Polski stanowi potencjalne źródło zakażenia konsu-

**Tab. 3. Oporność szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych z mleka**

Szczep nr	Antybiotyk						
	E	GE	CIP	AMP	TE	DO	CH
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-	-
6	+	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	+	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	+	-	+	-
15	+	-	-	+	-	-	-
16	-	-	-	+	-	-	-

Objaśnienia: (+) – oporny; (-) – wrażliwy; E – erytromycyna, GE – gentamycyna, CIP – ciprofloksacyna, AMP – ampicilina, TE – tetracyklina, DO – doksycyklina, CH – chloramfenikol

menta pałeczkami *Salmonella*. Liczba ta jest o tyle niepokojąca, że w 2004 r. tylko 0,5% badanych próbek mleka wykazywało wynik dodatni w kierunku występowania *Salmonella spp.* (10).

Wszystkie wyizolowane szczepy należały do serowaru *S. Enteritidis*. Uzyskany wynik można odnieść do sytuacji epidemiologicznej panującej w Europie, gdzie 45,7% zachorowań wywołanych jest właśnie przez ten serowar (5). Dane opublikowane przez Oska i wsp. (20) potwierdzają, że największa liczba odnotowanych przypadków salmonellozy w Polsce wywołana jest przez *S. Enteritidis*.

Geny plazmidowe, zdolne do autonomicznej replikacji, nie są niezbędne komórce bakteryjnej do wzrostu i podziału, zwiększają jednak pulę informacji genetycznej bakterii, wpływając w ten sposób na jej właściwości przystosowawcze. Informacje zapisane na plazmidowym DNA przekazywane są z komórki do komórki w procesie podziału (namnażania), jak również w procesie koniugacji, który ma istotne znaczenie dla ewolucji bakterii – umożliwia niebywale szybką zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiska (17). Zasadnicze znaczenie dla zjadliwości szczepów *Salmonella* ma obecność genów SpvB i SpvR, częściowy efekt dają produkty genów SpvC i SpvD, natomiast gen SpvA nie wpływa na zjadliwość. Geny te mogą występować w komórce bakteryjnej jako całe zgrupowanie 5 genów lub, co ma miejsce częściej, występują w różnych układach.

W przedstawionych badaniach tylko 3 z wyizolowanych z mleka szczepów *S. Enteritidis* wykazały obecność wszystkich pięciu genów spv, natomiast wszystkie szczepy wykazały obecność najmniej wpływającego na cechy zjadliwości genu SpvA. Geny SpvC i SpvD występowały rzadziej – odpowiednio, u 62,5% i 75% wyizolowanych szczepów. Najmniej rozpowszechnione w grupie badanych izolatów *S. Enteritidis* były geny SpvB i SpvR występujące w 56,6% szczepów. Uzyskane w badaniach własnych wyniki są zbieżne z wynikami Rodriguez-Rivery (21), który izolował salmonelle od bydła. Podobnie, Madajczak i Binek (17) w badaniu 107 szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych z mięsa drobiowego, wykazali obecność SpvA w 100% izolatów, natomiast geny SpvB i SpvR odnaleźli, odpowiednio, w 91,6% i 81,3% izolatów. Najmniej licznie występowały geny SpvC i SpvD – odpowiednio, w 76,6% i 71% szczepów. Obecność SpvR we wszystkich przypadkach stwierdził Bacci (2), badając izolaty *Salmonella Enterica*, natomiast Ammari (1) prowadząc badania na 16 izolatach *Salmonella spp.*, nie wykrył obecności genu SpvR. Znaczną liczbę łącznie 60 szczepów *Salmonella* pod kątem obecności 3 genów zgrupowania spv: B, C, R zbadał Derakhshandeh (3). Gen spvB wykrył w 43,3%; spvC w 73,3%, a spvR w 46,6% szczepów. Wyniki badań własnych i dane uzyskane przez innych autorów wskazują na wysoką zmienność i dynamikę układu spv na plazmidzie, co sugeruje duże zdolności adaptacyjne drobnoustrojów.

Oporność bakterii na antybiotyki jest istotnym i wciąż rosnącym problemem. Jak wynika z opublikowanego w 2016 r. raportu EFSA (5), około 30% szczepów *Salmonella* izolowanych od ludzi wykazuje oporność na najpowszechniej używane antybiotyki (tetracyklinę i ampicylinę). Niepokojąca jest ponadto stwierdzana wysoka, wynosząca ponad 26%, wielooporność, czyli oporność na kilka chemioterapeutyków jednocześnie, wśród izolowanych szczepów. W przedstawionych badaniach izolatów z mleka surowego tylko 2 z 16 (12,5%) były wrażliwe na wszystkie użyte w badaniu antybiotyki. Pozostałe szczepy wykazywały wrażliwość na jeden (56,25% szczepów) lub więcej (31,25% szczepów) antybiotyków. Najczęściej obserwowano oporność na powszechnie stosowaną ampicylinę (81,25%) i erytromycynę (50%), zaś wrażliwość na ciprofloksacynę, gentamycynę i chloramfenikol wykazało 100% badanych szczepów. Uzyskane wyniki badań wykazują zbieżność z wynikami dotyczącymi antybiotykooporności szczepów izolowanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt hodowlanych, otrzymanymi przez innych autorów (10, 14, 23). W badaniach własnych nie wykazano istotnego związku pomiędzy występowaniem genów ze zgrupowania spv a występowaniem oporności na antybiotyki. Brak było jedynie genu SpvB w obu szczepach wykazujących wrażliwość na wszystkie wykorzystane w badaniach antybiotyki. Wśród szczepów opornych na erytromycynę w 7 na 8 szczepów występował gen SpvC i SpvD oraz w 6 na 8 szczepów gen SpvB.

Stada bydła mlecznego są rezerwuarem wielu mikroorganizmów patogennych stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Koncentracja produkcji, przechodzenie z systemu hodowli indywidualnej do masowego chowu zwierząt może przyczyniać się do wzrostu liczby zatruc pokarmowych spowodowanych zanieczyszczonym salmonellami mlekiem. Wielkostatny system utrzymania zwierząt sprzyja występowaniu podklinicznych i utajonych zachorowań, a także rozwojowi nosicielstwa wśród zwierząt. Zwierzęta zakażone i nosiciele wydalając drobnoustroje patogene, w tym również pałeczki *Salmonella*, przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Wskutek zanieczyszczenia kałowego strzyków i sprzętu udojowego niepożądana mikroflora patogenna dostaje się do mleka (13). Tak więc surowe mleko i produkty z mleka niepasteryzowanego mogą być źródłem pałeczek z rodzaju *Salmonella* powodujących zatrucia i zakażenia pokarmowe (10-12, 19). Dane zebrane przez Instytut Ekonomiki Rolnictwa wskazują, że około 13% mleka pozyskiwanego na terenie Polski wykorzystywane jest bezpośrednio w gospodarstwach produkcyjnych i może być przyczyną tzw. rodzinnych zatruc pokarmowych (24). Wprowadzenie nowych, zautomatyzowanych metod pozyskiwania surowca mlecznego, ograniczających czynnik ludzki oraz poprawa ogólnych warunków higienicznych doju nie doprowadziła do wyeliminowania przypadków zanie-

czyszczenia mleka pałeczkami *Salmonella*. Z uwagi na obecność w surowym mleku szkodliwych dla zdrowia ludzi drobnoustrojów, w tym również *Salmonella* spp., EFSA (7) rekomenduje przeprowadzanie obróbki termicznej mleka przed jego spożyciem. Zauważona została również potrzeba informowania konsumentów o zagrożeniach związanych z konsumpcją surowego mleka.

Obecność bakterii *S. Enteritidis* w mleku zbiorczym z gospodarstw produkcyjnych stanowi istotne ryzyko wystąpienia zakażeń pokarmowych u ludzi. Występowanie genów zgrupowania spv we wszystkich izolatach bakterii z rodzaju *Salmonella* świadczy o dużych zdolnościach adaptacyjnych tych bakterii. Antybiotykooporność przynajmniej na jeden z chemioterapeutyków, obserwowana u większości szczepów wyizolowanych z mleka, stanowi istotną trudność w terapii zarówno zwierząt, jak i ludzi.

### Piśmiennictwo

1. Ammari S., Laglaoui A., En-Nanei L., Bertrand S., Wildemaue C., Barrijal S., Abid M.: Isolation, drug resistance and molecular characterization of *Salmonella* isolates in northern Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009, 3, 41-49.
2. Bacci C., Paris A., Salsi A., Bonardi S., Brindani F.: Relation between the presence of extrachromosomal DNA and virulence features in *Salmonella enterica* strains. *Ann. Fac. Medic. Vet. Parma* 2005, 25, 175-180.
3. Derakhshandeh A., Firouzi R., Khoshbakht R.: Association of Three Plasmid-Encoded spv Genes Among Different *Salmonella* Serotypes Isolated from Different Origins. *Indian J. Microbiol.* 2013, 53, 106-110.
4. El-Gazzar F., Marth E. H.: *Salmonellae*, salmonellosis and dairy foods: A review. *J. Dairy Sci.* 1992, 75, 2327-2343.
5. European Food Safety Authority.: Antimicrobial resistance on the rise in the European Union, EFSA and ECDC warn. *EFSA Journal* 2016, 14, 4634.
6. European Food Safety Authority.: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015. *EFSA Journal* 2015, 13, 4329.
7. European Food Safety Authority.: Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal* 2015, 13, 3940.
8. Haneda T., Okada N., Nakazawa N., Kawakami T., Danbara H.: Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*. *Infect. Immun.* 2001, 69, 2612-2620.
9. Heffernan E. J., Fierer J., Chikami G., Guiney D.: Natural history of oral *Salmonella dublin* infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence. *J. Infect. Dis.* 1987, 155, 1254-1259.
10. Hoszowski A., Wasyl D.: Występowanie i antybiotykooporność pałeczek *Salmonella* w Polsce. *Med. Weter.* 2005, 61, 660-662.
11. Jayarao B. M., Donaldson S. C., Straley B. A., Sawant A. A., Hegde N. V., Brown J. L.: A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 2451-2458.
12. Jayarao B. M., Henning D. R.: Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 2157-2162.
13. Jayarao B. M., Wang L.: A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 2620-2624.
14. Kessel J. S. van, Sonnier J., Zhao S., Karns J. S.: Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from bulk tank milk and milk filters in the United States. *J. Food. Prot.* 2013, 76, 18-25.
15. Libby S. J., Adams L. G., Ficht T. A., Allen C., Whitford H. A., Buchmeier N. A., Bossie S., Guiney D. G.: The spv genes on the *Salmonella Dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* 1997, 65, 1786-1792.
16. Libby S. J., Lesnick M., Hasegawa P., Weidenhammer E., Guiney D. G.: The *Salmonella* virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol.* 2000, 2, 49-58.
17. Madajczak G., Biniek M.: Znaczenie plazmidowego zgrupowania genów spv w chorobotwórczości pałeczek *Salmonella Enteritidis* dla kur. I. Występowanie genów zgrupowania spv w dużych plazmidach zjadliwości pałeczek *Salmonella Enteritidis* izolowanych od kur. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2005, 57, 163-174.
18. Majowicz S. E., Musto J., Scallan E., Angulo F. J., Kirk M., O'Brien S. J., Jones T. F., Fazil A., Hoekstra R. M.: The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 50, 882-889.
19. Oliver S. P., Jayarao B. M., Almeida R. A.: Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2005, 2, 115-129.
20. Osek J., Wieczorek K.: Występowanie zoonoz oraz czynników zoonotycznych u zwierząt i w żywności w Europie w 2013 r. *Żywiec* 2015, 90, 210-216.
21. Rodriguez-Rivera L. D., Wright E. M., Siler J. D., Elton M., Cummings K. J., Warnick L. D., Wiedmann M.: Subtype analysis of *Salmonella* isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human- and bovine-associated subtypes. *Vet. Microbiol.* 2014, 170, 307-316.
22. Roudier C., Fierer J., Guiney D. G.: Characterization of translation termination mutations in the spv operon of the *Salmonella* virulence plasmid pSDL2. *J. Bacteriol.* 1992, 174, 6418-6423.
23. Su L. H., Chiu C. H., Chu C., Ou J. T.: Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 42, 3353-3355.
24. Zwolińska M., Kowalski A., Seremak-Bulge J., Szajner P., Trajer M., Machowina E.: Rynek mleka stan i perspektywy. *Analizy rynkowe* 2015, 48, 3-43.

Adres autora: dr Agnieszka Wiszniewska-Łaszczych, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn; e-mail: aga@uwm.edu.pl