

ŁUCJA ŁANIEWSKA-MOROZ, BEATA NALEPA, KAZIMIERZ KORNACKI

Oporność na chemioterapeutyki pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowanych z żywności

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Technologii Żywności AR-T
Pl. Cieszyński 1, 10-957 Olsztyn-Kortowo

Łaniewska-Moroz Ł., Nalepa B., Kornacki K.

Resistance to chemotherapeutic agents of *Enterobacteriaceae* isolated from food

Summary

Sensitivity to chemotherapeutic agents of 57 strains of *Enterobacteriaceae* isolated from different food products was examined. Significant differences of sensitivity in particular chemotherapeutic agents were found.

The largest number of strains was resistant to penicillin (94.7% of all isolated strains). The percentage of strains resistant to trimethoprim was 63.2%, rifampicin – 56%, sulfamethoxazole – 47.4%, ampicillin – 42.1% and erythromycin – 38.6%. Lower percentages of strains were resistant to nitrofurantoin (26.3%), carbenicillin (22.8%), chloramphenicol (14%), oxytetracycline (12.3%), doxycycline and bisseptol (10.5%), colistin (8.8%). The resistance to neomycin, nalidixic acid and gentamycin was not detected among the isolated strains.

Pałeczki gramujemne występujące w produktach spożywczych stanowią dużą, różnorodną grupę bakterii, reprezentowaną przez takie rodzaje jak: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia* i inne (21). *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* i *Citrobacter*, jako składniki naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, stanowią wskaźnik stanu sanitarno-higienicznego żywności. Uważa się, że zanieczyszczenie żywności tymi bakteriami świadczy o niskim poziomie higieny w zakładzie produkcyjnym lub złej jakości surowca, lecz nie stwarza ono zagrożenia dla zdrowia konsumenta (1, 5-7, 18, 20).

Obserwuje się systematyczny wzrost populacji szczepów lekoopornych, co może sprawiać trudności w doborze antybiotyku do leczenia (4, 10, 19). Coraz większą rolę w rozprzestrzenianiu się oporności drobnoustrojów na chemioterapeutyki przypisuje się żywności, zwłaszcza zanieczyszczonej pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* (2, 8, 9, 22). Bakterie te występując w produktach żywnościowych mogą być źródłem lekooporności przekazywanej mikroflorze bytującej w przewodzie pokarmowym ludzi. Oporność drobnoustrojów na antybiotyki jest uwarunkowana obecnością plazmidów R (3), które mogą być przekazywane w toku koniugacji bakterii (21).

Celem pracy było określenie oporności na antybiotyki szczepów pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowanych z żywności.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły produkty żywnościowe pochodzące z sieci detalicznej. Obejmowały one następujące grupy wyrobów:

- produkty mleczarskie: serek „sourage”, twaróg tłusty, ser podpuszczkowy, lody czekoladowe „Calipso”;
- produkty mięsne: piersi z kurczaka, mięso wieprzowe;
- wędliny i wyroby wędliniarskie: szynka, szynka „wiejska”, polędwica, baleron, kiełbasa wyborcza, kiełbasa biała, kiełbasa zwyczajna, salami, salceson;
- wyroby garmażeryjne: befszyk tatarski, galaretko wieprzowa, flaki;
- ryby: filet śledziowy, łosoś wędzony;
- produkty warzywne: surówka (marchew, kapusta biała i czerwona, natka pietruszki), mrożonka warzywna mieszana.

Izolację pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* przeprowadzono na podłożu Mac Conkey'a i VRBL. Wyrósłe kolonie bakterii różniące się pod względem morfologii identyfikowano stosując rzędy biochemiczne. Równolegle w badanych produktach wykonano oznaczenia obecności pałeczek z grupy *coli* i *Escherichia coli* w celu określenia ich zgodności z obowiązującą dla danego produktu Polską Normą (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Następnie oznaczono wrażliwość zidentyfikowanych szczepów wobec wybranych antybiotyków metodą dyfuzyjno-krążkową. Stosowano krążki produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek BIOMED Warszawa. W tym celu 20 godz. hodowle badanych szczepów rozcieńczano w stosunku 1:10 000 jałowym 0,85% roztworem chlorku sodowego. Z tak rozcieńczonej hodowli 2-3 cm³ nano-

szone na powierzchnię podłoża Mueller-Hintona. Po 10 minutach nadmiar hodowli usuwano pipetą, po czym układano krążki bibułowe o średnicy 6 mm, nasycone odpowiednimi antybiotykami. Po półgodzinnej preinkubacji płytek w temp. otoczenia, a następnie 18-godzinnej inkubacji w temp. 37°C, dokonywano pomiaru średnicy stref zahamowanego wzrostu szczepów bakterii wokół krążków.

Wrażliwość wyizolowanych szczepów określono wobec: antybiotyków β -laktamowych (penicylina P10, karbenicylina CB100, ampicylina Am); antybiotyków aminoglikozydowych (streptomycyna S, gentamycyna Ge, neomycyna N); antybiotyków polipeptydowych (kolistyna Ks); tetracyklin (doksycyklina Dk, oksytetracyklina T); ryfamycyn (rifampicyna Rf); sulfonamidów (biseptol Bs, trimetoprim Tm, sulfametoksazol Su); makrolidów (erytromycyna E); pochodnych furanu (nitrofurantoina Nf); kwasu nalidiksowego Na oraz chloramfenikolu C.

Jako kryterium oporności szczepów (zgodnie z zaleceniami producenta) wobec penicyliny przyjęto średnicę zahamowanego wzrostu szczepu ≤ 14 mm, wobec karbenicyliny ≤ 17 mm, ampicyliny ≤ 13 mm, streptomycyny ≤ 14 mm, gentamycyny ≤ 12 mm, neomycyny ≤ 12 mm, kolistyny ≤ 11 mm, doksycykliny ≤ 14 mm, oksytetracykliny ≤ 14 mm, rifampicyny ≤ 12 mm, erytromycyny ≤ 13 mm, nitrofurantoiny ≤ 16 mm, kwasu nalidiksowego ≤ 13 mm oraz wobec chloramfenikolu ≤ 17 mm. W przypadku biseptolu, za oporny uznawano szczep, którego średnica strefy zahamowanego wzrostu była równa lub mniejsza od stref przy krążku trimetoprimu i sulfametoksazolu. Szczepy uznawano za oporne wobec sulfametoksazolu, gdy strefa zahamowanego

wzrostu wokół krążka biseptolu była równa strefie krążka trimetoprimu przy jednoczesnym braku strefy wokół krążka sulfametoksazolu, natomiast szczep uznawano za oporny na trimetoprim, gdy strefa zahamowania wzrostu była mniejsza lub równa strefom wokół krążków biseptolu i sulfametoksazolu.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały, że badane produkty spożywcze (osiemdziesiąt przebadanych próbek) odpowiadały wymaganiom Polskiej Normy (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Wyizolowano z nich 57 szczepów (z 22 próbek) należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, które po identyfikacji zostały zaliczone do następujących rodzajów: *Escherichia coli* – 32 szczepy, *Morganella morganii* – 2, *Serratia marcescens* – 2, *Proteus rettgeri* – 2, *Providencia sp.* – 2, *Citrobacter sp.* – 3, *Enterobacter sp.* – 1, *Hafnia sp.* – 3 i *Klebsiella sp.* – 10 szczepów. Udział poszczególnych rodzajów wyizolowanych szczepów przedstawiono na ryc. 1.

Najczęściej z produktów żywnościowych izolowano pałeczki *Escherichia coli* (56% wszystkich wyizolowanych szczepów). Rodzaj *Klebsiella sp.* stanowił 17,5%, a rodzaje *Citrobacter sp.* i *Hafnia sp.* stanowiły 5,3% wyizolowanych szczepów. Natomiast częstość występowania *Morganella morganii*, *Proteus rettgeri* i *Serratia marcescens* wynosiła 3,5%. Rodzaj *Enterobacter sp.* stanowił 1,8% wszystkich wyizolowanych szczepów.

W badaniach dotyczących występowania pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* w produktach mle-

Tab. 1. Występowanie pałeczek gramujemnych w badanych produktach spożywczych

Rodzaj produktu	Wyizolowane pałeczki gramujemne	Liczba (%) wyizolowanych szczepów
Mleczarskie: serek „sourage”, twaróg tusty, ser podpuszczkowy, lody czekoladowe	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Hafnia sp.</i> <i>Proteus rettgeri</i>	6 (50) 2 (16,7) 2 (16,7) 1 (8,3) 1 (8,3)
Mięsne: piersi z kurczaka mięso wieprzowe	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Citrobacter sp.</i>	3 (43) 3 (43) 1 (14)
Wędliny, wyroby wędliniarskie i garmazeryjne: szynka, szynka „wiejska”, połówka, baleron, kiełbasa wyborcza, kiełbasa biała, kiełbasa zwyczajna, salami, salceson, befsztyk tatarski, galaretki wieprzowa, flaki;	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Hafnia sp.</i> <i>Citrobacter sp.</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Proteus rettgeri</i> <i>Providencia sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i>	17 (53,3) 5 (16,7) 2 (6,7) 2 (6,7) 2 (6,7) 1 (3,3) 1 (3,3) 1 (3,3)
Ryby: filet śledziowy, łosoś wędzony	<i>Escherichia coli</i>	2 (100)
Warzywno: surówka, mrożonka warzywna	<i>Escherichia coli</i> <i>Providencia sp.</i>	5 (83,3) 1 (16,7)

czarskich Maciejska-Rocznan i Burzyńska (8) stwierdziły bardzo duże zanieczyszczenie tymi bakteriami. W serkach homogenizowanych, twarogach, serach dojrzewających, śmietanie i mleku dominowały pałeczki *Escherichia coli*. Ich obecność stwierdzono w 97 (72%) ze 135 przebadanych próbkach. Stwierdzono również obecność trzech gatunków z rodzaju *Klebsiella*: *pneumoniae*, *oxytoca*, *rhinocleromatis* w 77 (57%) próbkach oraz szczepów *Enterobacter*, *Hafnia* sp., *Serratia marcescens* i *Citrobacter* sp. Porównując te wyniki z uzyskanymi w niniejszych badaniach, można stwierdzić, iż wśród izolowanych z produktów mleczarskich (serki „sourage”, twarogi, sery podpuszczkowe, lody) szczepów również dominowały pałeczki *Escherichia coli* (50% wyizolowanych szczepów). Wyizolowano także szczepy *Klebsiella* sp. (16,7%), *Morganella morganii* (16,7%) oraz bakterie *Proteus rettgeri* (8,3%) i *Hafnia* sp. (8,3%). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1. W badaniach Burzyńskiej i Steca (2) najczęściej izolowanym gatunkiem były pałeczki *Escherichia coli*, głównie z produktów mleczarskich. Z rodzaju *Enterobacter* dominowały gatunki *Enterobacter liquefaciens*, a z rodzaju *Klebsiella* – *Klebsiella pneumoniae* i *ozae*.

Wrażliwość na chemioterapeutyki szczepów w poszczególnych grupach produktów żywnościowych przedstawiono w tab. 2. Szczepy wyizolowane z produktów mleczarskich wykazywały oporność na 12 spośród 17 stosowanych chemioterapeutyków. Największy odsetek szczepów (83,3%) wykazywał oporność na penicylinę. Ponad 50% szczepów (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*) wykazywało oporność wobec trimetoprimu. Najmniejszy odsetek (8,3%) szczepów opornych (*Morganella morganii*) stwierdzono wobec doksycykliny i biseptolu. Szczepy wyizolowane z produktów mleczarskich okazały się wrażliwe na streptomycynę, karbenicylinę, neomycynę, kwas nalidiksowy i gentamycynę.

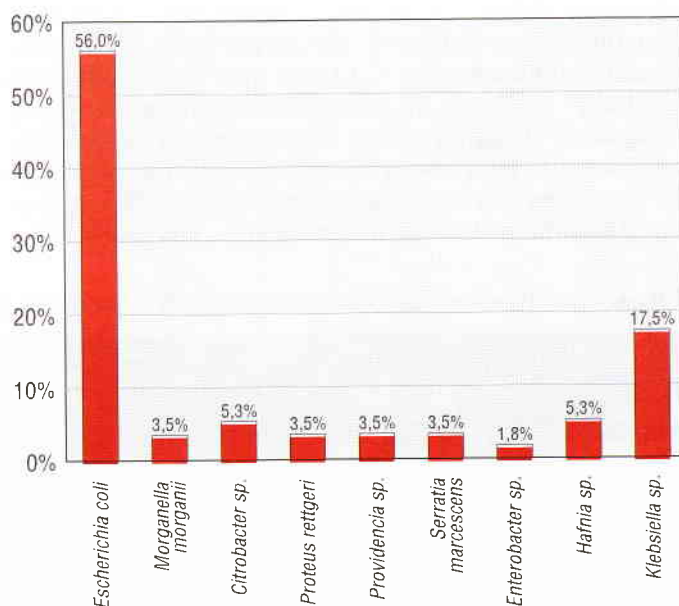
Szczepy wyizolowane z produktów mięsnych wykazywały oporność wobec ośmiu chemioterapeutyków. Ponad połowa szczepów (57,1%) wykazała oporność na rifampicynę i nitrofurantoinę. Wszystkie szczepy były odporne na penicylinę. Nie stwierdzano natomiast oporności szczepów na działanie streptomycyny, kolistyny, neomycyny, doksycykliny, oksytetracykliny, gentamycyny, chloramfenikolu i biseptolu. Burzyńska i Stec (2) w badaniach nad

Tab. 2. Odsetek szczepów opornych w badanych grupach produktów spożywczych

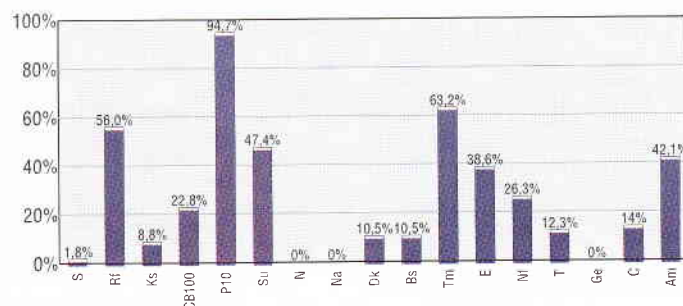
Rodzaj produktu	Liczba zbadanych szczepów	S	Rf	Ks	CB100	P10
Mleczarskie	12	-	33,3	25	-	83,3
Mięsne	7	-	57,1	-	14,3	100
Wędliny, wyroby wędliniarskie i garmazeryjne	30	3,3	63,3	6,7	33,3	100
Ryby	2	-	100	-	-	100
Warzywne	6	-	50	-	33,3	83,3

Objaśnienia: S – streptomycyna, Su – sulfametoksazol, Tm – trimetoprim, C – chloramfenikol, Na – kwas nalidiksowy, Nf – nitrofurantoina, CB 100 – karbenicylina, Dk – doksycyklina,

opornością bakterii wyizolowanych z produktów spożywczych stwierdzili duży odsetek szczepów opornych wobec erytromycyny (65,6%), ampicyliny (38,8%) i oksytetracykliny (26,8%). Badania



Ryc. 1. Rodzaje pałeczek gramujemnych wyizolowanych z produktów spożywczych



Ryc. 2. Procentowy udział szczepów opornych na stosowane w badaniach chemioterapeutyki

Odsetek szczepów opornych na chemioterapeutyki											
Su	N	Na	Dk	Bs	Tm	E	Nf	T	Ge	C	Am
41,7	-	-	8,3	8,3	58,3	25	33,3	16,7	-	25	25
28,6	-	-	-	-	57,1	14,3	14,3	-	-	-	28,6
63,3	-	-	16,7	16,7	66,7	53,3	30	16,7	-	16,7	46,7
-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100
16,7	-	-	-	-	83,3	16,7	16,7	-	-	-	50

Rf – rifampicyna, N – neomycyna, E – erytromycyna, Am – ampicylina, Ks – kolistyna, T – oksytetracyklina, P 10 – penicylina, Bs – biseptol, Ge – gentamycyna

obejmowały nie tylko bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, ale i bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Większość wyizolowanych szczepów *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.* oraz wszystkie szczepy *Enterobacter sp.* była oporna na erytromycynę.

Szczepy wyizolowane z wędlin, wyrobów wędliniarskich i garmażeryjnych wykazywały oporność na 14 z 17 stosowanych chemioterapeutyków. Duży odsetek szczepów wykazywał oporność wobec trimetoprimu (66,7%), rifampicyny i sulfametoksazolu (63,3%) oraz wobec erytromycyny (53,3%). Prawie połowa wyizolowanych szczepów (46,7%) była oporna na ampicylinę. Jeden szczep wykazał oporność w stosunku do streptomycyny. Wszystkie szczepy były odporne na penicylinę. Nie stwierdzano natomiast oporności wobec neomycyny, kwasu nalidiksoowego i gentamycyny.

Z badanych próbek ryb (filet śledziowy, łosoś wędzony) wyizolowano dwa szczepy *Escherichia coli*, które wykazały oporność wobec czterech chemioterapeutyków: rifampicyny, erytromycyny, ampicyliny i penicyliny.

Wyizolowane z produktów warzywnych szczepy pałeczek gramujemnych wykazały oporność wobec 8 chemioterapeutyków. Dominowały szczepy odporne na penicylinę i trimetoprim (83,3% wyizolowanych szczepów). Szczepy odporne na rifampicynę i ampicylinę stanowiły 50%, a 33,3% – szczepy odporne wobec karbenicyliny. Najmniejszy odsetek stanowiły szczepy wykazujące oporność wobec sulfametoksazolu, erytromycyny i nitrofurantoiny (16,7%). Wśród wyizolowanych szczepów nie stwierdzono opornych na streptomycynę, kolistynę, neomycynę, kwas nalidiksowy, doksycyklinę, oksytetracyklinę, gentamycynę, chloramfenikol i biseptol.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono duże różnice wrażliwości badanych szczepów w stosunku do poszczególnych chemioterapeutyków

(ryc. 2). Antybiotykiem, wobec którego stwierdzono najczęściej szczepów opornych była penicylina (94,7% wszystkich wyizolowanych szczepów). Odsetek szczepów opornych na trimetoprim wynosił 63,2%, na rifampicynę – 56%, na sulfametoksazol – 47,4%, na ampicylinę – 42,1%, a na erytromycynę – 38,6%. Niższy odsetek szczepów opornych stwierdzono wobec nitrofurantoiny (26,3%), karbenicyliny (22,8%), chloramfenikolu (14%), oksy-

tetracykliny (12,3%), doksycykliny i biseptolu (10,5%) oraz kolistyny (8,8%). Nie stwierdzono występowania oporności żadnego wyizolowanego szczepu wobec neomycyny, kwasu nalidiksoowego, gentamycyny i tylko jeden szczep okazał się oporny na streptomycynę.

Piśmiennictwo

- Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PZWL, Warszawa 1984.
- Burzyńska H., Stec E.: Roczn. PZH 31, 187, 1980.
- Chua-Cabrera E.: Philippine J. Sci. 117, 385, 1988.
- Dzierżanowska D.: Mat. XXIII Zjazdu Polskiego Tow. Mikrobiologów, Łódź 1996, s. 10.
- Kwiatek K., Różańska H.: Medycyna Wet. 52, 29, 1996.
- Maciejka-Roczan K., Burzyńska H.: Roczn. PZH 31, 193, 1980.
- Maciejka-Roczan K., Burzyńska H.: Roczn. PZH 32, 107, 1981.
- Maciejka-Roczan K., Burzyńska H.: Roczn. PZH 33, 185, 1982.
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: J. Food Prot. 60, 226, 1997.
- Ngoma M., Suzuki A., Takashima I., Sato G.: Jpn. J. Vet. Res. 41, 1, 1993.
- PN-89/A-86730. Ryby i przetwory rybne. Badania mikrobiologiczne.
- PN-90/A-75052/11. Przetwory owocowe, warzywne i warzywno-mięsne. Metody badań mikrobiologicznych. Oznaczanie obecności, miana i najbardziej prawdopodobnej liczby pałeczek z grupy *coli*.
- PN-90/A-75052/12. Przetwory owocowe, warzywne i warzywno-mięsne. Metody badań mikrobiologicznych. Oznaczanie obecności i miana pałeczek *Escherichia coli*.
- PN-93/A-86034.08. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Bakterie z grupy *coli* – wykrywanie obecności, oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) i oznaczanie liczby metodą płytkową.
- PN-93/A-86034.09. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. *Escherichia coli* – wykrywanie obecności i oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL).
- PN-A-82055-10:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii z grupy *coli*.
- PN-A-82055-11:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii *Escherichia coli*.
- Smith H. R., Scotland S. M.: J. Clin. Pathol. 46, 10, 1993.
- Tait S., Amey S.G.B.: Epidemiol. Infect. 113, 247, 1994.
- Zaleski S. J.: Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego. WNT, Warszawa, 1985.
- Zaremba M.L., Borowski J.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWL, Warszawa, 1994.
- Zhao T., Clavero M.R.S., Doyle M.P., Beuchat L.R.: J. Food Prot. 60, 215, 1997.

Adres autora: dr Lucja Łaniewska-Moroz, Pl. Cieszyński 1, 10-957 Olsztyn-Kortowo