



IDENTYFIKACJA GENÓW ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI I WIRULENCJI W GENOMIE *AEROMONAS CAVIAE*

mgr Łukasz Jałowiecki
Instytut Ekologii Terenów
Uprzemysłowionych
Katowice, 19 stycznia 2021

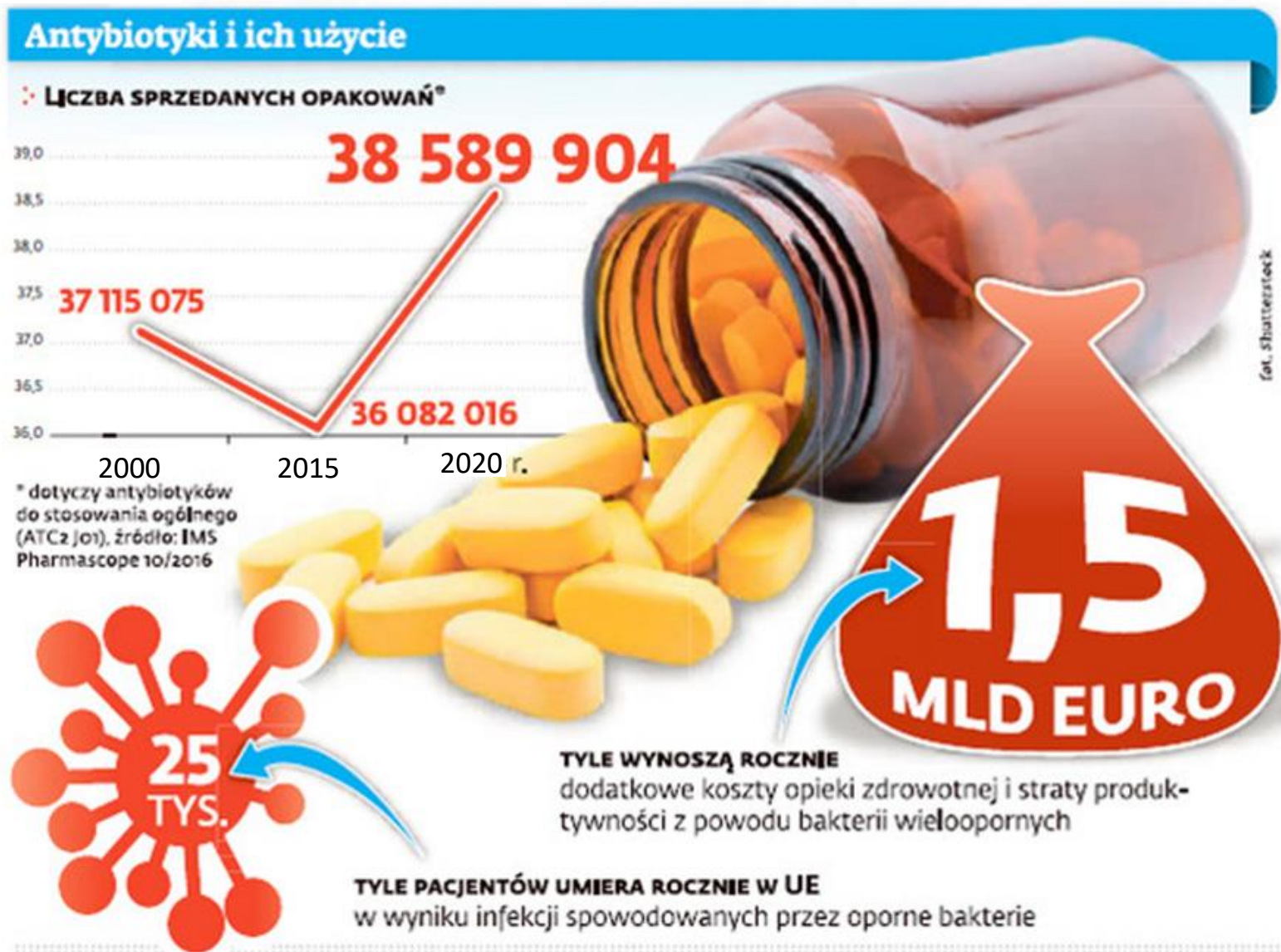
ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ



80 000 zgonów w Chinach,
30 000 zgonów w Tajlandii,
25 000 w Europie,
23 000 w USA.

Konsumpcja antybiotyków, zarówno w lecznictwie szpitalnym jak i otwartym, systematycznie wzrasta. W 1997 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła narastający problem antybiotykooporności. Niewłaściwe i nadmierne stosowanie antybiotyków jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za powstawanie i rozprzestrzenianie się mechanizmów oporności drobnoustrojów

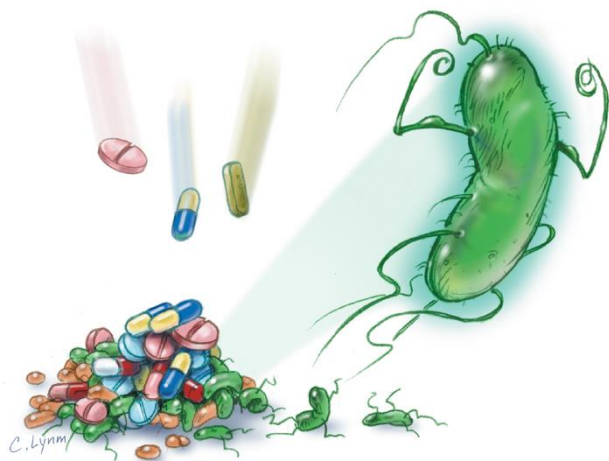
ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ



ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ

Bakterie wytwarzają mechanizmy, dzięki którym stają się odporne na działanie antybiotyków. Mogą wykorzystywać jedną metodę bądź łączyć kilka jednocześnie. Wśród poznanych mechanizmów antybiotykooporności bakterii można między innymi wyróżnić:

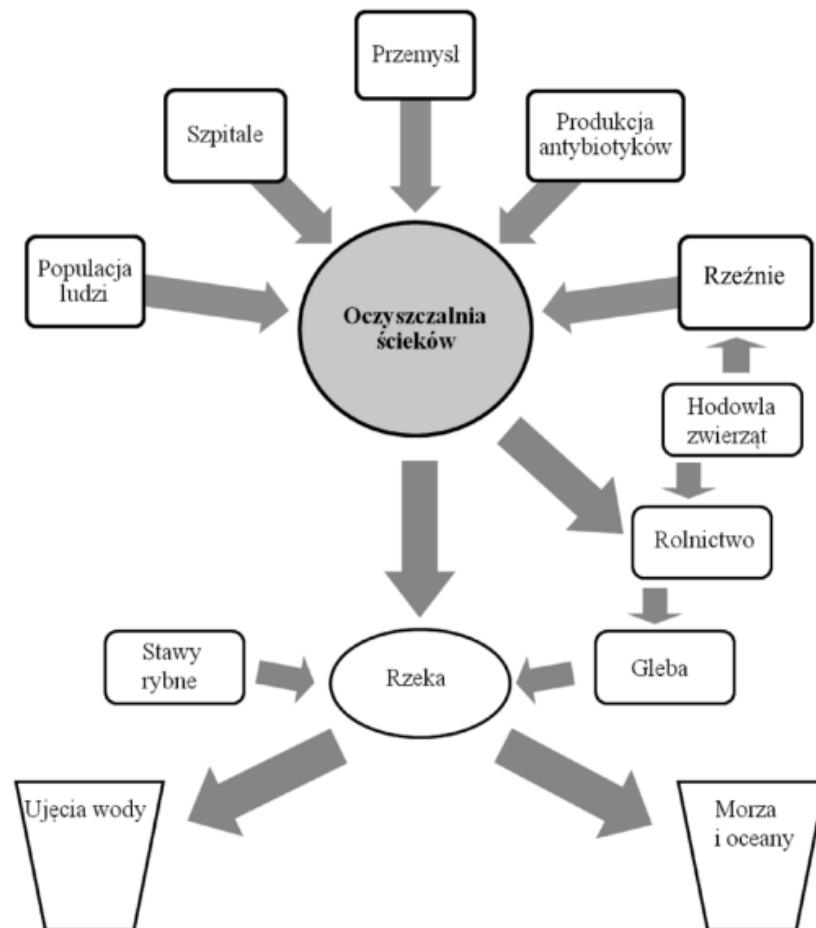
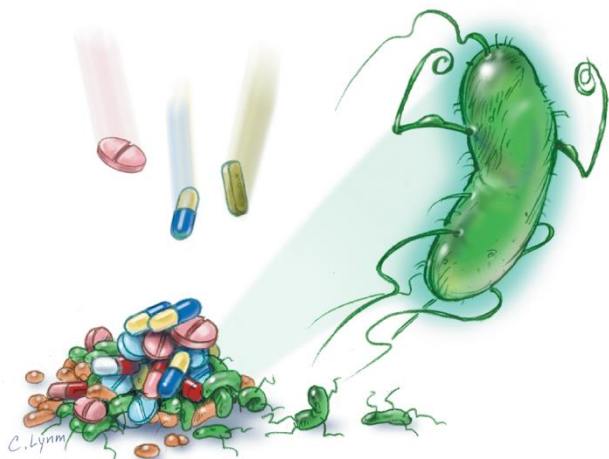
- modyfikowanie miejsca, w którym docelowo działa lek,
- inaktywowanie leku przez enzymy bakteryjne,
- usuwanie antybiotyku z komórki bakteryjnej przez wyspecjalizowane „pompy”,
- zahamowanie transportu leku do wnętrza komórki.



np. β -laktamazy, które rozkładają antybiotyki β -laktamowe (penicyliny, cefalosporyny),

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ

Głównym miejscem rozprzestrzeniania się antybiotykooporności są oczyszczalnie ścieków, uważane za istotny rezerwuár genów oporności

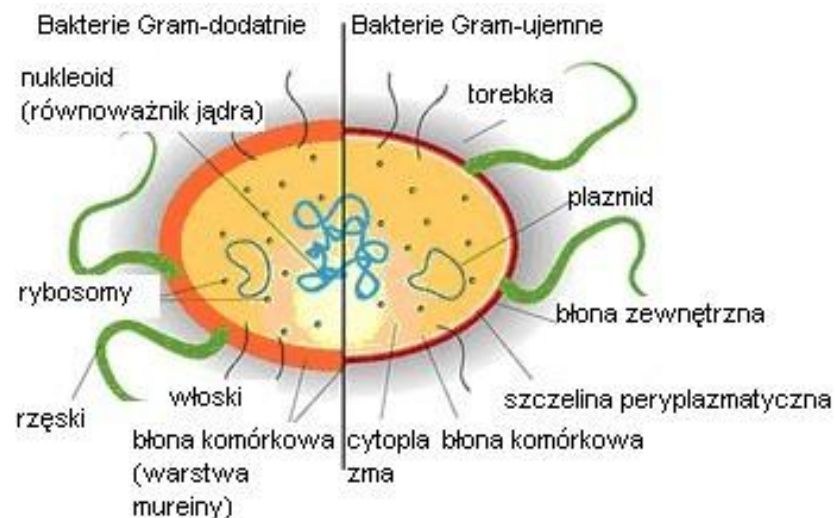


WIRULENCJA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH

Wirulencję, określaną także zjadliwością, definiuje się jako zdolność drobnoustroju patogennego do wywołania choroby.

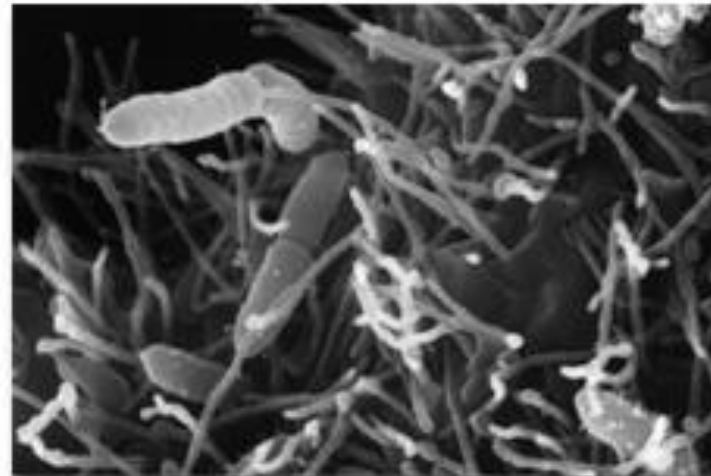
O zjadliwości bakterii decydują następujące cechy:

- zakaźność, to zdolność patogenu do wniknięcia w tkanki gospodarza i przebywania w nich
- inwazyjność, to zdolność drobnoustroju do pokonywania barier obronnych ustroju, namnażania się i rozprzestrzeniania w organizmie;
- toksyczność, to zdolność do wytwarzania toksyn lub uwalniania produktów pochodzących z procesów metabolicznych lub rozpadu komórek



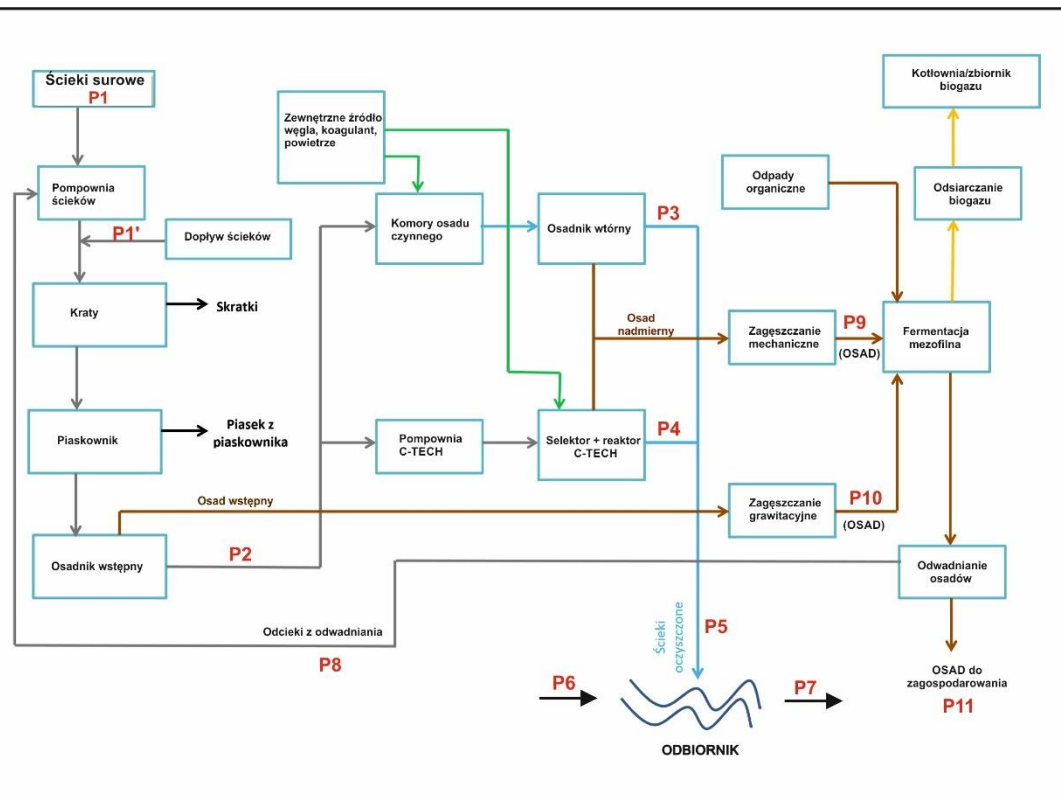
CEL PRACY

Celem pracy była analiza genomu pod kątem antybiotykooporności i wirulencji bakterii *Aeromonas caviae* wyizolowanych z ścieków surowych oraz oczyszczonych pobranych z miejskiej oczyszczalni ścieków.



Scanning electron micrograph of *Aeromonas* sp. bacteria adhering to human epithelial cells

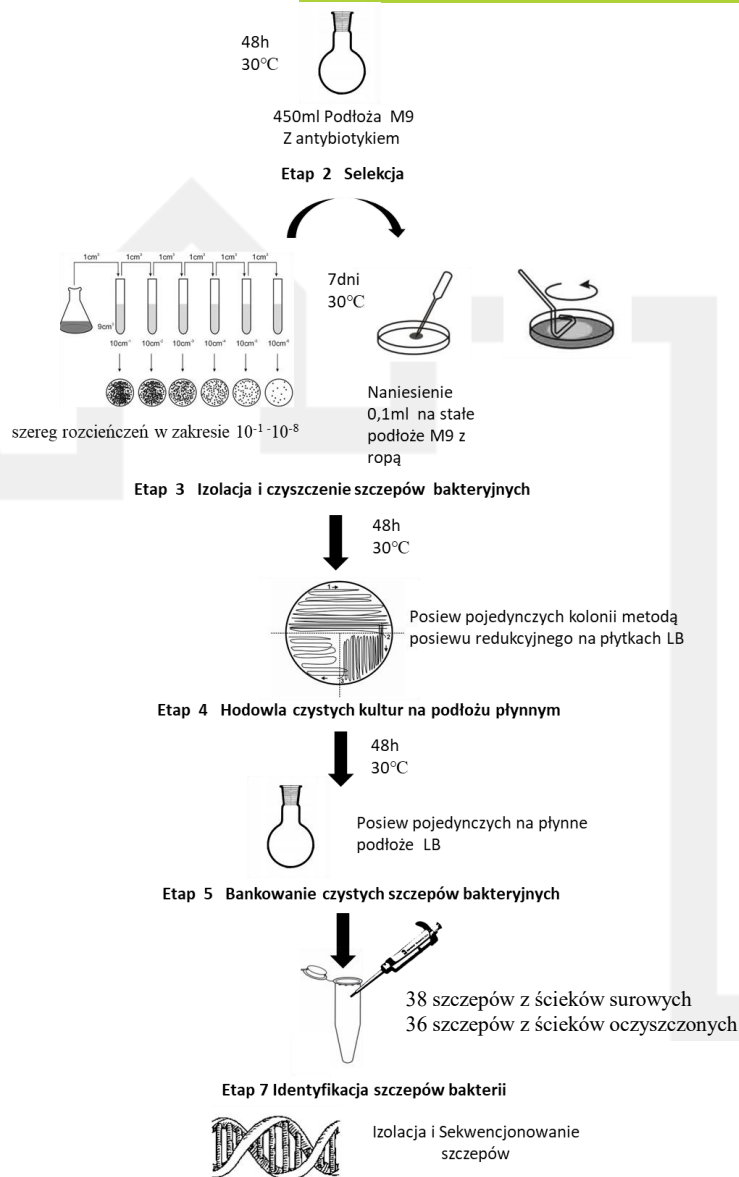
MIEJSCE POBORU PRÓB



Szczepki wyizolowano z surowych (RW) i oczyszczonych (TW) ścieków z oczyszczalni ścieków Tychy-Urbnowice zlokalizowanej w południowej części Polski (N 50° 5' 35.881; E 19° 3' 32.202)

Oczyszczalnia ścieków Tychy-Urbnowice

SKRINING MIKROORGANIZMÓW DO BADAŃ



6 układów doświadczalnych

- ofloksacyna (16mg/l) + norfloksacyna (16mg/l)
- streptomycyna (20mg/l) + kanamycyna (20mg/l) + gantamycyna (20mg/l)
- ryfampicyna (10mg/l)
- tetracyklina (20mg/l)
- ofloksacyna (16mg/l)
- norfloksacyna (16mg/l)



MO BIO
Laboratories, Inc.
Now a QIAGEN company

QIAGEN

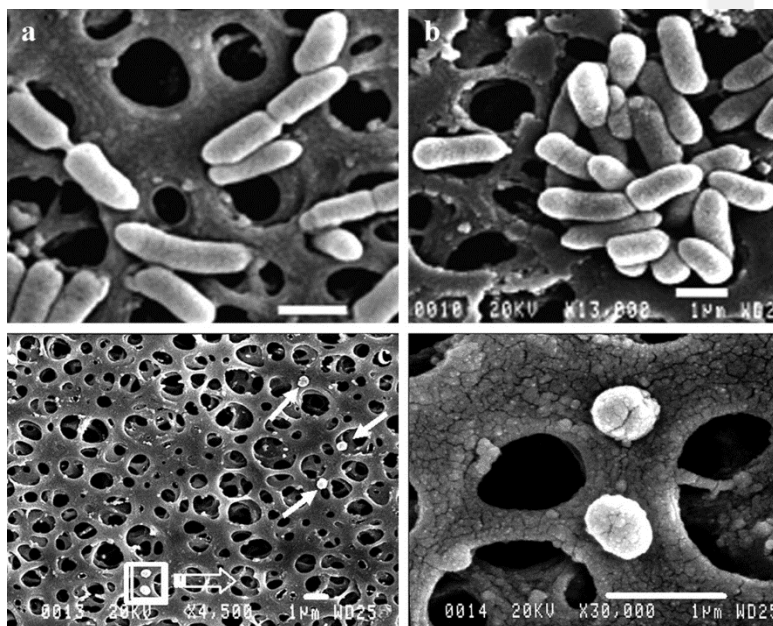
AEROMONAS CAVIAE

- oksydazododatnie pałeczki Gram ujemne
- występują we wszystkich środowiskach wodnych
- mezofile
- oportunistyczne patogeny ludzkie
- wywołują najczęściej biegunki, zapalenie żołądka i jelit, zakażenia ran oraz infekcje dróg żółciowych i moczowo-płciowych



AEROMONAS

[morphology, background, cultural characteristics, habitat, biochemical characteristics]



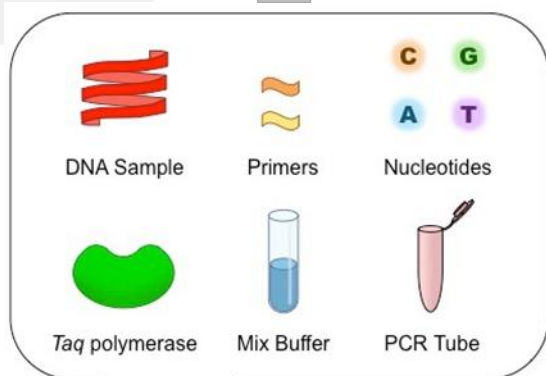
Czynniki wirulencji u *Aeromonas caviae*:

- enzymy wydzielane pozakomórkowo tj.: aerolizyna, o właściwościach hemolitycznych i cytolitycznych,
- cytotoksyczna enterotoksyna-Act,
- cytotoniczne enterotoksyny (termolabilna Alt i ciepłostąła Ast),
- proteazy,
- elastazy,
- acetylotransferaza,
- glicerofosfolipid/cholesterol .
- fimbrie, białka błony zewnętrznej,
- warstwa białkowa S.

IDENTYFIKACJA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI I WIRULENCJI

Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR, analiza sekwencji

Geny wirulencji :
Act, aer, ast hlyA



Thermal Cycler



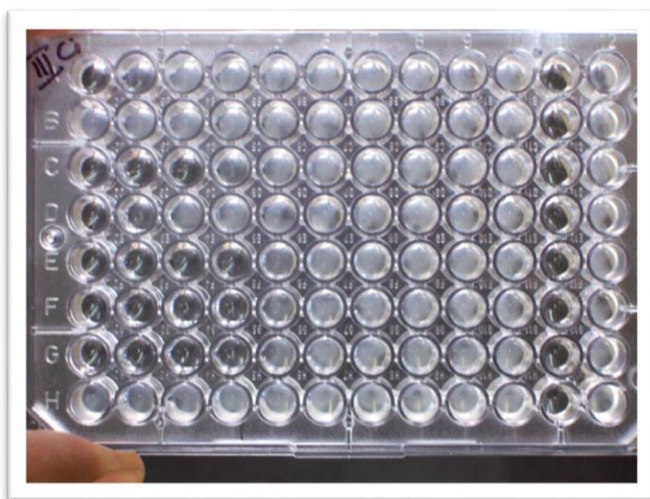
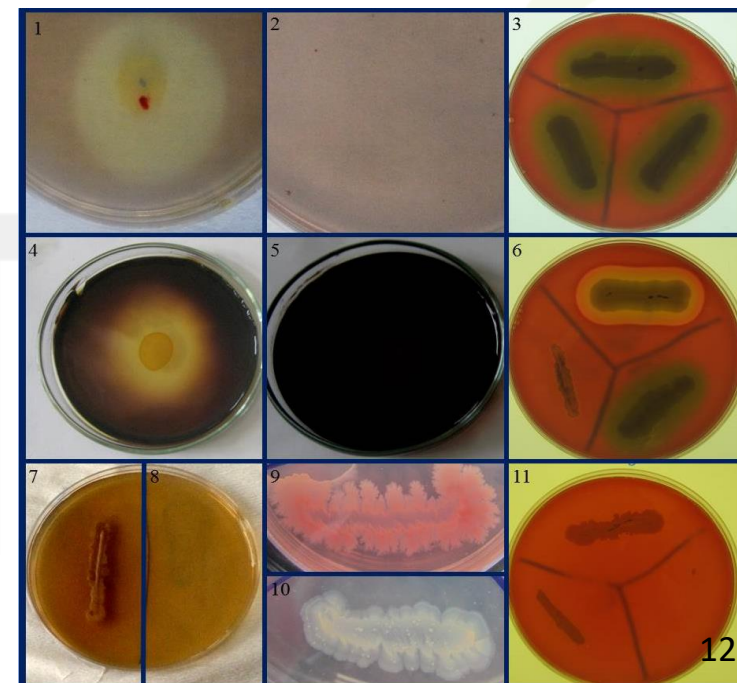
PCR Cycle

Nazwa genu	Sekwencja starteru (5'-3')	Amplicon (bp)	Annealing temperatura (°C)	Bibliografia
<i>intI1</i>	LC1-GATCGGTCGAATGCGTGT LC5-GCCTTGATGTTACCCGAGAG	196	50	Figueira i wsp. ²¹
<i>intI2</i>	LC2-TGCTTTTCCACCCCTTAC LC3-GACGGCTACCCTCTGTTATCTC	195	55	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCT A	482	55	Harnisz & Korzeniewska ²⁵
<i>qnrA</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT ATTTCTCACGCCAGGATTG	516	53	Hubeny i wsp.. ²⁶
<i>qnrB</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	54	Guo i wsp. ²²
<i>qnrD</i>	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA CGAGATCAATTTACGGGGAAT	465	50	
<i>qnrS</i>	AACAAGCTGAAGCGCCTG GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	54	Hall ²⁴
<i>oqxA</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG CTCGGCGGATGATGCT	392	57	
<i>oqxB</i>	CCACTCTTCACGGGAGACGA TCCTGATCTCCATTAACGCCCA	131	64	
<i>qepA</i>	ACCGGAACCCATCTCGATGC CCAGCTCGGCAACTTGATAC	570	60	
	ATGCTCGCCTTCCAGAAAA			

IDENTYFIKACJA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI I WIRULENCJI

Klasyczne metody analizy antybiotykooporności i wirulencji

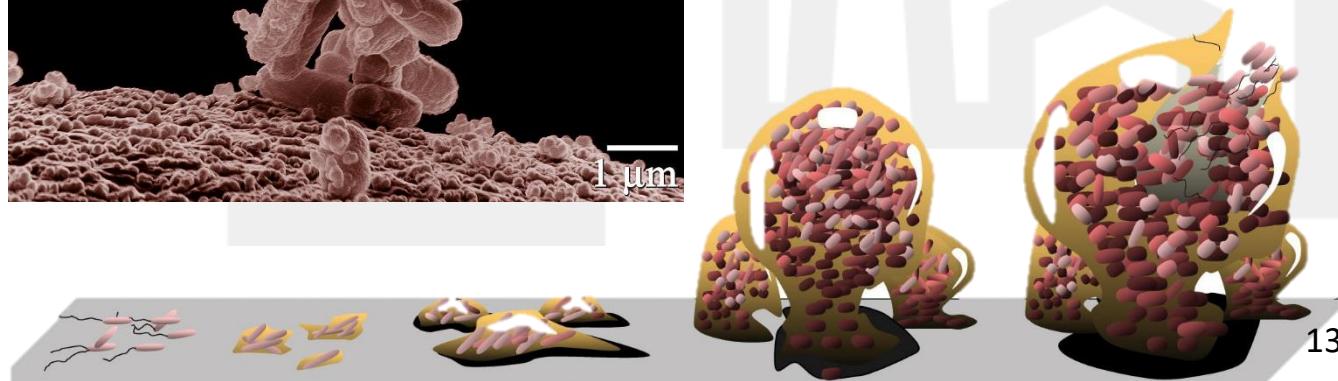
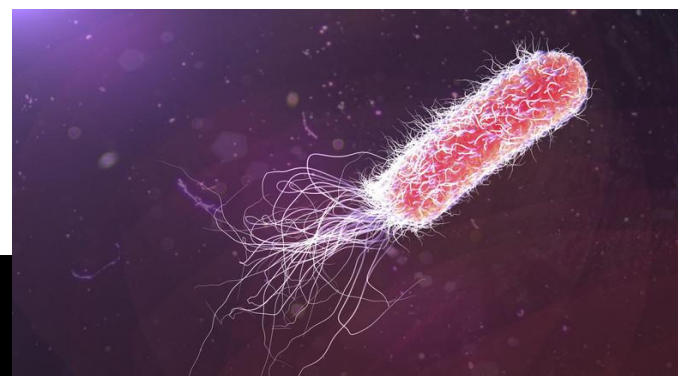
1. Oznaczanie antybiotykooporności metodą krążkowo-dyfuzyjną
2. Oznaczenie aktywności enzymatycznej (enzymy z grupy lipaz, ureaz, lakaz i celulaz, proteaz)
3. Analiza aktywności hemolitycznych
4. Analiza minimalnych stężeń hamujących (MIC) metali



IDENTYFIKACJA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI I WIRULENCJI

Klasyczne metody analizy antybiotykooporności i wirulencji

1. Analiza tworzenia biofilmu
2. Test ruchliwości szczepów *Aeromonas caviae*
3. Analiza produkcji biosurfaktantów



[illegible]

Geny antybiotykooporności oraz wirulencji w genomie szczepów *Aeromonas caviae*

Aminoglikozydy

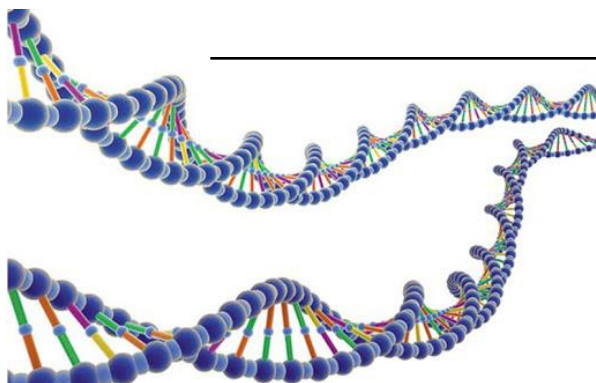
B-laktamy

makrolidy

A. <i>caviae</i>	Geny antybiotykooporności	Geny wirulencji
TW-2	A7J11; aac_6_Ila; aac_6_Ib; aph_3_Ia; arr; bla_{MOX}; bla_{OXA-10}; bla_{OXA-38}; catB3; mph_A; qacE	<i>cheY; exeE; exeF; exeG; flhG; fliE; fliG; fliM; fliN; fliP; flmH; hlyA; mrkB; mrkC; mrkD; mrkF; pomA2; tapT; amoA; cheA; cheV; cheW; exeA; exeD; exeF; exeI; exeJ; exeN; flgC; flgL; flhA; flhB; fliA; fliF; fliI; fliL</i>
TW-6	<i>A7J11; mph_A; aac_6_Ib; aph_3_Ia; arr; qacE; bla_{OXA-10}; bla_{OXA-38}; catB3; bla_{MOX}; aac_6_Iia</i>	<i>cheY_7; exeE; exeF; exeG; fliE_22; fliM_2; fliN_21; flmH; mrkB+; mrkD+; mrkF+; nueA_2; tapT; amoA; cheV_7; cheW_2_1; cluster_69; exeA_1; exeD_1; exeF_2; fleR_flrC+; flgC_18; flgG_10; flgK_16; flhA_17; flhB_31; flhB_32; flhB_38; flhG+; fliF_21; fliF_23; fliG_3; fliI_25; fliP_18; hlyA_4; hutA_4; mrkC+_1; pomA2; tapQ_1; tapU_1</i>

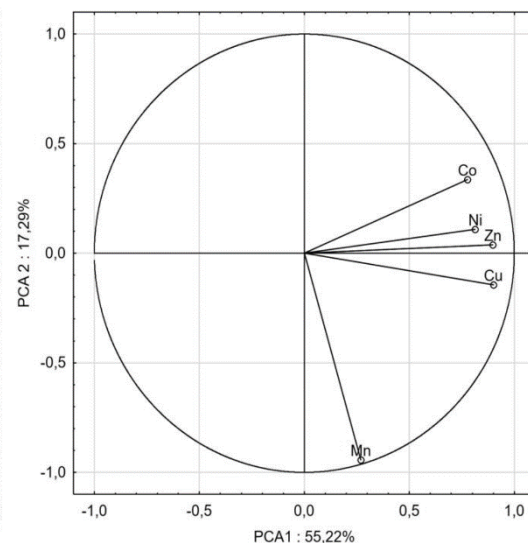
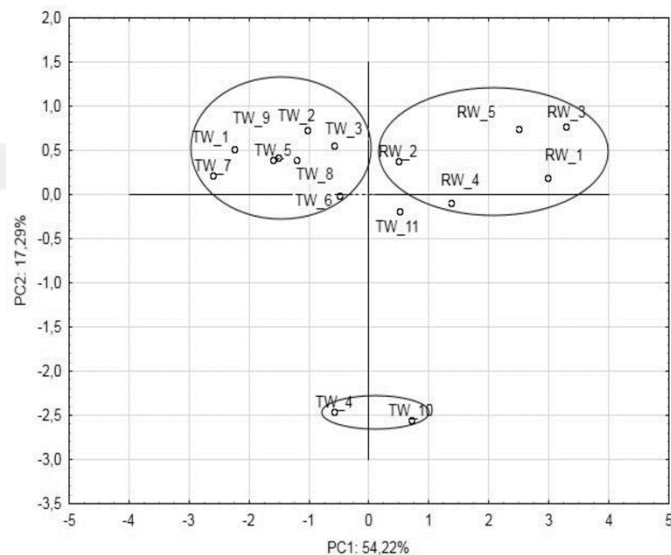
Geny kodujące:

- Flagelinę,
- Fimbrie
- substancje agregującą
- podjednostki większej cytolizyny
- białka powierzchniowego



WYNIKI

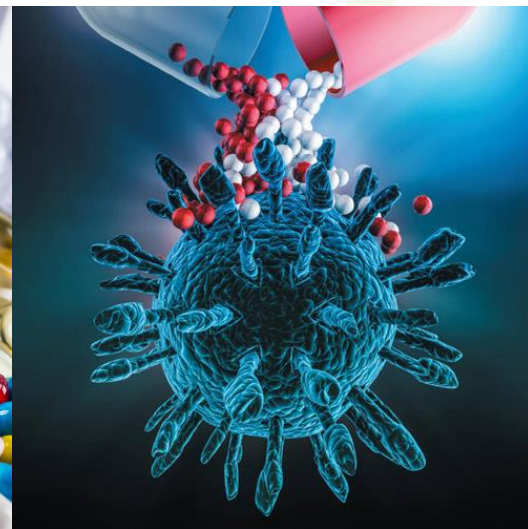
W pracy podjęto próbę określenia zależności między wartościami MIC metali, a wskaźnikami MAR. Za pomocą analizy PCA, nie stwierdzono zależności między wartościami wskaźników MIC i MAR



- Obecność bakterii opornych w ściekach wymaga podejmowania kompleksowych badań, mających na celu poznanie ich fizjologii, cech wirulentnych, biochemicznych i genetycznych. Pozwala to określić ich wpływ na bezpieczeństwo zdrowotne ludzi oraz na rozprzestrzenianie się zjawiska lekooporności.
- Wyizolowane z ścieków bakterie *Aeromonas caviae* wykazały zdolność tworzenia biofilmu oraz stwierdzono obecność wielu z zasadniczych czynników wirulencji, tj. zdolności do hemolizy, obecność genów fimbri, pilusów co może świadczyć o ich chorobotwórczości.

WNIOSKI

Biorąc pod uwagę obecność genów lekooporności, jak i możliwość występowania różnych czynników wirulencji warunkujących ich patogenność, należy rozważyć włączenie pałeczek z rodzaju *Aeromonas* do rutynowych badań mikrobiologicznych ścieków, a zwłaszcza do monitoringu funkcjonowania oczyszczalni ścieków.





Microbiology
Resource Announcements

Advanced Search

Home Articles Types of Resources For Authors About the Journal

Genome Sequences

Whole-Genome Sequences of Antibiotic-Resistant *Aeromonas caviae* Isolated from Treated Wastewater

Łukasz Jałowicki, Grażyna Piłża, Monika Nowrotek

Christina A. Cuomo, Editor

DOI: 10.1128/MRA.00645-20



Article

Figures & Data

Info & Metrics

PDF

ABSTRACT

The presented data provide new information on antibiotic resistance and virulence genes in the genomes of *Aeromonas caviae* strains TW-2 and TW-6, isolated from treated wastewater. The results confirm the presence of multi-antibiotic-resistant *Aeromonas caviae* strains with virulence properties as "high-risk isolates" in treated wastewater.

ANNOUNCEMENT

Aeromonas species are becoming food and waterborne pathogens, causing a wide spectrum of diseases in humans and animals (1, 2). Among the leading pathogenic species are *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae*. They are emerging opportunistic human

pubmed.gov

Advanced

Save

Email

Send to

Display options

Search

User Guide

> Microb Drug Resist. 2020 Jun 18. doi: 10.1089/mdr.2019.0287. Online ahead of print.

Fluoroquinolone Resistance and Virulence Properties Among Wastewater *Aeromonas caviae* Isolates

Monika Nowrotek¹, Łukasz Jałowicki¹, Grażyna Piłża¹

Affiliations + expand

PMID: 32552456 DOI: 10.1089/mdr.2019.0287

Abstract

The study provides data on antibiotic resistance as well as the virulence characteristics of *Aeromonas caviae* isolated from raw and treated wastewater. The isolates were identified as *A. caviae* by 16S rRNA gene sequencing. In the analyzed strains, high frequency for the following genes was observed: *aac(6)-Ib-cr*, *qnrB*, and *qnrD*. The presence of *qnrA* and *ogxB* genes was not found in any strain. The higher frequency of the investigated genes was observed in strains from raw wastewater (RW). Multiple antibiotic resistance indices ranged from 0.36 to 0.69. Susceptibility to six heavy metals (Cd^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , and Ni^{+2}) was recorded for all the isolates. The order of metal resistance of *A. caviae* was $Co > Cu > Zn > Cd > Ni > Mn$. All the strains of *A. caviae* showed β -hemolytic activity. Enzymes of amylase, cellulase, and lipase were produced by all isolates. Only the strains from RW had the ability to form biofilms and showed motility. The obtained results indicate that wastewater is a potential source and/or reservoir of virulent and multidrug-resistant *A. caviae* as "high-risk isolates."

Keywords: *Aeromonas caviae*; antibiotic and metal resistance; fluoroquinolones; virulence properties; wastewater.

FULL TEXT LINKS

Mary Ann Lillard

ACTIONS

Cite

Favorites

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

Related information



Instytut Ekologii
Terenów Uprzemysłowionych
Ul. Kossutha 6, 40-844 Katowice
www.ietu.pl
ietu@ietu.pl

Dziękuję za uwagę