

Justyna MAZUREK, Katarzyna BALDY-CHUDZIK*

WYKORZYSTANIE ANALIZY STATYSTYCZNEJ ILORAZU SZANS (ODDS RATIO) W BADANIACH WIELOLEKOOPORNOŚCI

Prezentowane badania dotyczą wykorzystania analizy statystycznej ilorazu szans do określenia prawdopodobieństwa współwystępowania określonych genów oporności na antybiotyki wśród komensalnych, wielolekoopornych *Escherichia coli* pochodzących od dwóch grup trzody chlewnej, z różną presją antybiotyków. W tym celu przebadano 51 szczepów od grupy świń w trakcie trwania antybiotykoterapii oraz 86 szczepów od świń po upływie 2,5 miesiąca od zakończenia terapii. Określono ich wrażliwość na 14 antybiotyków z 8 klas oraz zbadano obecność genów warunkujących oporność na te antybiotyki, na które stwierdzono najczęstszą oporność. Wśród izolatów od obu grup zwierząt stwierdzono wysokie odsetki wielolekooporności, oraz zróżnicowane rozpowszechnienie genów oporności na ampicylinę (*bla_{TEM}*), tetracykliny (*tetA,B,C,D*), streptomycynę (*strA/B,aadA1*), sulfonamidy (*sul1,2,3*) oraz trimetoprim (*dfrA1,7*). Statystycznie istotną, dodatnią korelację u *E. coli* od świń z podażą antybiotyków wykazało 9 par genów, zaś 7 par korelację ujemną. Wśród *E. coli* od świń po antybiotykoterapii, stwierdzono dodatnią korelację dla 11 par genów oraz ujemną dla jednej pary genów. Występowały różnice pomiędzy parami asocjujących genów oraz siłą asocjacji genów w obrębie *E. coli* pochodzących od grup zwierząt. Dla części par genów stwierdzono dodatnie korelacje u szczepów pochodzących od obu grup świń, natomiast niektóre dodatnie korelacje występowały tylko u jednej grupy badanej. Analiza ilorazu szans pozwoliła na oszacowanie lokalizacji badanych genów na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy i integrony oraz na wyznaczenie genów które będą odpowiadać za wielolekooporność w badanej populacji po zaprzestaniu stosowania antybiotyków.

1. WSTĘP

Oporność na antybiotyki jest zdolnością przeciwstawiania się bakterii hamującemu lub bakteriobójczemu działaniu środka antybiotycznego. Cecha ta pojawia się w komórce mikroorganizmu w wyniku spontanicznej mutacji lub przez nabywanie genów

* Uniwersytet Zielonogórski, Katedra Biologii Molekularnej; ul. Monte Cassino 21b, Zielona Góra; j.mazurek@wnb.uz.zgora.pl

oporności na antybiotyki. Bakterie są zdolne do przyjmowania obcych elementów DNA takich jak plazmidy, transpozony, integrony i kaskady genowe [3, 21], które mogą być rozprzestrzeniane nawet pomiędzy różnymi gatunkami bakterii za pomocą horyzontalnego transferu genów [14]. Gromadząc kilka genów oporności na różne antybiotyki, bakterie stają się wielolekooporne. Do nasilenia tego zjawiska dochodzi podczas presji wywołanej obecnością antybiotyku w środowisku. Stosowanie antybiotyków wywołuje więc jednocześnie kształtowanie oraz rozpowszechnianie oporności. Obecny stan wiedzy wskazuje, że wysoka lekooporność dotyczy zarówno bakterii patogennych jak i komensalnych [19, 24]. Znaczącą pulę stanowiącą rezerwar genów oporności stanowią bakterie komensalne pochodzące od zwierząt, głównie hodowlanych [16]. Ze względu na zagrożenie publiczne wynikające z szerzenia się szczepów opornych, wprowadzono programy monitorowania oporności w tym dotyczące komensalnych bakterii od zwierząt hodowlanych, wskazując *Escherichia coli* jako jeden z indykatorów [6]. Pomocne w analizach rozprzestrzeniania się oporności mogą być analizy statystyczne, które wskazują na istotność otrzymanych wyników dla danej populacji, wskazują na siłę zależności zaobserwowanych cech oraz pozwalają na określenie prawdopodobieństwa pojawienia się ponownie zaobserwowanego zjawiska w innych populacjach. Iloraz szans (OR) reprezentuje prawdopodobieństwo, że dwie określone cechy występujące w danej populacji są zależne, oraz wskazuje na siłę tej zależności [9, 20]. Oszacowania interesującej wielkości ilorazu szans dokonuje się na podstawie pobranej próby losowej i w wyniku takiego oszacowania otrzymuje się tzw. przedział ufności dla OR w populacji wyznaczając przedział liczbowy spełniający z wysoką wiarygodnością warunek, że otrzymana wartość OR jest prawdziwą wartością ilorazu szans badanych cech dla całości populacji [23]. Celem prezentowanych badań było wykorzystanie analizy statystycznej ilorazu szans do określenia prawdopodobieństwa współwystępowania określonych genów oporności na antybiotyki wśród komensalnych wielolekoopornych *Escherichia coli* pochodzących od trzody chlewnej. Dodatkowo porównano populacje bakterii pochodzące od zwierząt poddawanych antybiotykoterapii oraz po jej zakończeniu.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał do badań stanowiły kałowe szczepy *Escherichia coli* pochodzące od trzody chlewnej z jednego gospodarstwa rolnego. Próbkę pobierano od 2 grup zwierząt (po 25 sztuk) – pierwszej, którym podawane były antybiotyki: sulfonamid, trimetoprim i ampicylina, oraz od drugiej grupy świń, które były 2,5 miesiąca po zakończeniu antybiotykoterapii. W oparciu o badania biochemiczne, metodę fingerprinting

PCR oraz analizę filogenetyczną [2] wyodrębniono 51 nieidentycznych szczepów od pierwszej, oraz 86 szczepów od drugiej grupy świń.

2.2. FENOTYPOWE BADANIE OPORNOŚCI

Oporność na antybiotyki badano metodą krążkowo – dyfuzyjną na agarze Mueller Hinton (Merck) zgodnie z normami CLSI [4]. Testowano wrażliwość na 14 antybiotyków z 8 grup: penicylin: ampicylinę (AM 10 μ g) i piperacylinę (PIP 10 μ g); cefalosporyn: cefalotynę (CF 30 μ g), cefuroksym (CXM 30 μ g) i cefoperazon (CFP 75 μ g); aminoglikozydów: streptomycynę (S 10 μ g), gentamycynę (G 10 μ g) oraz neomycynę (N 30 μ g); tetracyklin: tetracyklinę (T 30 μ g) i doksycyklinę (D 30 μ g); chloramfenikoli: chloramfenikol (C 30 μ g); nitrofuranów: nitrofurantoinę (FM 300 μ g), sulfonamidów: sulfametoksazol/trimetoprim (STX 1.25/23.75 μ g); chinolonów: kwas nalidiksowy (NA 30 μ g) (Becton Dickinson). *E. coli* ATCC 25922 stosowano jako szczep referencyjny. Wielolekooporność określano w przypadku, gdy występowała oporność na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej klas [13].

2.3. IDENTYFIKACJA GENÓW OPORNOŚCI

Obecność genów oporności na antybiotyki: ampicylinę: *bla*_{TEM}, (kodujący β -laktamazę hydrolizującą pierścień strukturalny antybiotyku), genów oporności na streptomycynę: *strA* /*B*, i *aadA1* (kodujących adenylotransferazy unieczynnijające antybiotyk), tetracykliny: *tetA*, *tetB*, *tetC* (kodujące białka transportowe aktywnie usuwające antybiotyk z komórki), sulfonamidy: *sul1*, *sul2*, *sul3* (warunkujące nadekspresję PABA – cząsteczki docelowej antybiotyku) oraz trimetoprim: *dfrA1* i *dfrA7* (nadekspresja DHFR- reduktazy dihydrofolianowej, będącej miejscem działania antybiotyku) wykrywano za pomocą reakcji PCR i elektroforezy w żelu agarozowym [18].

2.4. ANALIZA STATYSTYCZNA

Iloraz szans (odd – ratio) wyraża się wzorem (1):

$$OR = \frac{p}{1-p} \quad (1)$$

gdzie p to prawdopodobieństwo sukcesu, a $1-p$ jest prawdopodobieństwem porażki. W przypadku analizy genotypów w populacji, sukcesem jest pojawienie się określonego genotypu, a p określa prawdopodobieństwo (częstość) jego pojawienia się. Prawdopodobieństwo występowania określonego genotypu może zależeć od innych czynników – w danym przypadku rozważono zależność od występowania innego geno-

typu. Współzależność zapisano w postaci funkcyjnej, stosując się funkcję logistyczną (2):

$$\text{logit}(p_{\text{genotyp1}}) = \log\left(\frac{p_{\text{genotyp1}}}{1-p_{\text{genotyp1}}}\right) = \beta_0 + \beta_1 \chi_{\text{genotyp2}} \quad (2)$$

gdzie: p_{genotyp1} to prawdopodobieństwo pojawienia się genotypu 1; χ_{genotyp2} ma wartość 1, gdy pojawia się genotyp 2, lub 0 gdy genotyp 2 się nie pojawia. W poniższych analizach wykorzystano analizę logistyczną do opisanego częstości pojawiania się określonego genotypu w zależności występowania innego genotypu. Obliczenia i analizy wykonano przy za pomocą programu statystycznego R version 2.15.0.

3. WYNIKI

Badania wrażliwości na antybiotyki szczepów *E. coli* od świń z podażą antybiotyków, wykazały wysokie odsetki oporności na większość testowanych grup antybiotyków. Najwyższą oporność stwierdzono na streptomycynę (100%), następnie sulfmetaksazol/trimetoprim (92%) i ampicylinę (82%), cefalotyne (86%) oraz tetracyklinę (Tab1.) Szczepy *E. coli* izolowane od zwierząt bez podażu antybiotyków wykazywały niższe odsetki oporności, przy czym również najwyższą oporność wykazywały w stosunku do streptomycyny (81%) oraz sulfmetaksazolu/ trimetoprimu (73%) (Tab. 1).

W przypadku szczepów z obu grup stwierdzono wysokie odsetki szczepów wielolekoopornych. Wśród *E. coli* od świń w czasie podażu antybiotyków, 96% wykazywało wielolekooporność, natomiast po zakończeniu kuracji wielolekooporność wykazywało 60% szczepów (Tab. 2).

Analizowane szczepy badano następnie w kierunku genotypu oporności. Wśród szczepów opornych na ampicylinę stwierdzono występowanie genu *bla_{TEM}*, i jego rozpowszechnienie było proporcjonalne do liczebności szczepów opornych w obu grupach zwierząt (Tab. 3). Wśród *E. coli* opornych na streptomycynę wykryto obecność dwóch genów oporności: *strA/B* oraz *aadA1* i w przypadku *E. coli* od świń w trakcie antybiotykoterapii oba geny występowały z podobną częstością, natomiast wśród szczepów od świń po kuracji przeważała obecność genu *aadA1*. Oporność na tetracyklinę była warunkowana przez trzy różne geny *tetA*, *tetB* i *tetC*, przy czym gen *tetA* występował najczęściej u szczepów z obu grup zwierząt. Gen *tetB* występował częściej u *E. coli* od świń z drugiej grupy natomiast gen *tetC* częściej u świń z pierwszej grupy. Częstość rozpowszechnienia wszystkich zidentyfikowanych genów oporności na sulfmetaksazol - *sul* była wysoka u szczepów od zwierząt w czasie kuracji, natomiast po kuracji dominowała obecność genu *sul3*. Wśród szczepów opornych na trimetoprim od obu grup świń dominowało występowanie genu *dfrA1* nad *dfrA7* (Tab. 3).

Tabela 1. Oporność szczepów *E. coli* pochodzących od grup zwierząt z różną podażą antybiotyków

Antybiotyk	Liczba (%) szczepów opornych na antybiotyki wyizolowanych od świń	
	Grupa I (antybiotyki +)	Grupa II (antybiotyki -)
Ampicylina	42 (82)	25 (29)
Piperacylina	41 (80)	24 (28)
Cefalotyna	44 (86)	17 (20)
Cefuroksym	3 (6)	0 (0)
Cefoperazon	3 (6)	0 (0)
Streptomycyna	51 (100)	70 (81)
Gentamycyna	17 (33)	1 (1)
Nitrofurantoina	0 (0)	2 (2)
Tetracyklina	33 (65)	37 (43)
Doksycyklina	24 (47)	33 (38)
Sulfametoksazol/trimetoprim	47 (92)	63 (73)
Chloramfenikol	21 (41)	26 (30)
Nitrofurantoina	2 (4)	0 (0)
Kwas nalidiksowy	4 (8)	1 (1)

Tabela 2. Wielolekooporność szczepów *E. coli* pochodzących od grup zwierząt w trakcie antybiotykoterapii i po jej zakończeniu

Grupa świń	Liczba (%) szczepów		
	Wrażliwych	Opornych na 1-2 grupy antybiotyków	Wielolekoopornych
Grupa I (antybiotyki +)	0 (0)	2 (4)	49 (96)
Grupa II (antybiotyki -)	5 (6)	29 (34)	51 (60)

W celu określenia, czy istnieje asocjacja pomiędzy genami oporności wykrytymi w badanych izolatach, i czy współwystępowanie niektórych genów oporności wśród szczepów wielolekoopornych wykazuje zależności statystyczne, wykonano analizę korelacji stosując test Chi kwadrat. Stwierdzono znaczące korelacje ($P < 0,05$) w odniesieniu do występowania poszczególnych genów oporności (Tab. 4, 5). Dodatnia wartość dla β_1 oznacza, że pojawienie się danego genotypu zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia innego genotypu, można mówić więc o korelacji dodatniej. Ujemna wartość dla β_1 oznacza, że pojawienie się genotypu zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia innego genotypu, i korelację określa się wówczas jako ujemną.

Statystycznie istotną, pozytywną korelację wykazano dla 9 par genów wykrytych u *E. coli* od świń w czasie antybiotykoterapii (Tab.4). Najsilniejszy związek stwierdzono pomiędzy występowaniem genów *tetC* oraz *sul3* (OR=68), *strA/B* i *sul2*

(OR=53,25), oraz *strA/B* wraz z *aadA1* (OR= 20,25), niższy dla genów *tetA* i *sul1* (OR=7,36) i *aadA1* i *dfrA1* (OR=6,75), pozostałe korelacje przedstawiono w tabeli 4. Stwierdzono również ujemne korelacje dla par genów: *sul2* i *sul3* (OR=0,03), *bla_{TEM}* i *dfrA1* (OR=0,03); *tetA* i *tetC* (OR=0,09), *sul1* i *sul3* (OR=0,12), *bla_{TEM}* i *tetA* (OR=0,12), *tetA* i *sul3* (OR=0,21), *tetC*- *sul1* (OR=0,26).

Tabela 3. Rozpowszechnienie genów oporności wśród szczepów *E. coli* pochodzących od grup zwierząt w trakcie antybiotykoterapii i po jej zakończeniu

Grupa świń	Liczba (%) szczepów z wykrytymi genami oporności odpowiadającymi za oporność na:										
	Ampicylinę	Streptomycynę		Tetracykliny			Sulfmetaksazol			Trimetoprim	
	<i>bla_{TEM}</i>	<i>strA/strB</i>	<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA7</i>
Grupa I (antybiotyki+)	37 (72)	32 (63)	31 (61)	22 (43)	2 (4)	17 (33)	29 (57)	22 (43)	19 (37)	7 (14)	3 (6)
Grupa II (antybiotyki -)	23 (27)	7 (8)	26 (30)	21 (24)	14 (16)	2 (2)	6 (7)	6 (7)	14 (16)	21 (24)	3 (3)

W przypadku analizy korelacji występowania genów u *E. coli* od świń 2,5 miesiąca po kuracji, stwierdzono istotnie statystyczną, pozytywną asocjację dla 11 par genów. Najsilniejszą korelację stwierdzono pomiędzy genami *sul2* i *dfrA7* (OR=39,50), następnie *strA/B* i *sul2* (OR=19), *sul1* i *dfrA1* (OR=18,53), *strA/B* i *aadA1* (OR=17,70), *bla_{TEM}* i *sul1* (OR=17,22), *aadA1* i *sul3* (OR=12), *sul1* i *sul2* (OR=9,50) (Tab.5). Ujemną korelację w tej grupie badanej stwierdzono dla pary genów *tetA* – *tetB* (OR=0.09).

Stwierdzono różnice pomiędzy parami asocjujących genów oraz siłą asocjacji genów w obrębie *E. coli* pochodzących od grup zwierząt (Tab.6). Korelacja pomiędzy genami *tetC* i *sul3* oraz *strA/B* i *sul1* występowała tylko u *E. coli* od świń w czasie presji antybiotykowej, natomiast w przypadku par genów *bla_{TEM}* i *sul1*; *sul1* i *sul2*; *sul1* i *dfr1*; *sul2* i *dfr1*; *sul2* z *dfr7* istotna statystycznie korelacja występowała tylko u izolatów od świń bez presji antybiotykowej. Podobny stopień korelacji w przypadku obu analizowanych grup stwierdzono dla par genów *tetA* – *aadA1* i *tetA* – *sul1*, *strA/B* – *aadA1*; *aadA1* – *dfr1*, oraz również dodatni ale o różnej sile korelacji dla par genów *strA/B* – *sul2*, *aadA1* – *sul3*.

Tabela 4. Analiza korelacji występowania genów oporności u szczepów *E. coli* pochodzących od świń w trakcie antybiotykoterapii

Genotyp 1	Genotyp 2	Iloraz szans (OR)	Przedział ufności 2,5–97,5%	Wartość Chi kwadrat (χ^2)	Funkcja logistyczna (β_1)
<i>bla_{TEM}</i>	<i>tetA</i>	0,12	0,02–0,45	0,0037	-2,1595
<i>bla_{TEM}</i>	<i>sul1</i>	-	-	-	-
<i>bla_{TEM}</i>	<i>dfrA1</i>	0,03	0,00–0,19	0,0018	-3,5835
<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	-	-	-	-
<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	0,09	0,01–0,40	0,0042	-2,3716
<i>tetA</i>	<i>aadA1</i>	3,64	1,11–13,55	0,0402	1,2928
<i>tetA</i>	<i>sul1</i>	7,36	2,12–30,93	0,0030	1,9966
<i>tetA</i>	<i>sul2</i>	3,21	1,03–20,62	0,0484	1,1662
<i>tetA</i>	<i>sul3</i>	0,21	0,05–0,72	0,0182	-1,5731
<i>tetC</i>	<i>sul1</i>	0,26	0,07–0,86	0,0318	-1,3437
<i>tetC</i>	<i>sul3</i>	53,25	11–462,55	0,0000	4,0298
<i>strA/B</i>	<i>aadA1</i>	20,25	5,17–99,47	0,0001	3,0082
<i>strA/B</i>	<i>sul1</i>	3,77	1,17–13,07	0,0294	1,3275
<i>strA/B</i>	<i>sul2</i>	68	7,48–1597,70	0,0009	4,2195
<i>aadA1</i>	<i>sul3</i>	3,75	1,28–11,78	0,0188	1,3218
<i>aadA1</i>	<i>dfrA1</i>	6,75	2,10–24,90	0,0021	1,9095
<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	-	-	-	-
<i>sul1</i>	<i>sul3</i>	0,12	0,03–0,41	0,0013	-2,1282
<i>sul1</i>	<i>dfrA1</i>	-	-	-	-
<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	0,03	0,00–0,17	0,0012	-3,5370
<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	-	-	-	-
<i>sul2</i>	<i>dfrA7</i>	-	-	-	-

Tabela 5. Analiza korelacji występowania genów oporności u szczepów *E. coli* pochodzących od świń po zakończeniu antybiotykoterapii

Genotyp 1	Genotyp 2	Iloraz szans (OR)	Przedział ufności 2,5–97,5%	Wartość Chi kwadrat χ^2	Funkcja logistyczna β_1
<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	-	-	-	-
<i>blaTEM</i>	<i>sul1</i>	17,22	257–341,46	0,0116	2,8462
<i>blaTEM</i>	<i>dfrA1</i>	-	-	-	-
<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	0,09	0,00–0,47	0,0214	-2,4423
<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	-	-	-	-
<i>tetA</i>	<i>aadA1</i>	4,86	1,73–14,28	0,0031	1,5805
<i>tetA</i>	<i>sul1</i>	7,41	1,33–56,83	0,0274	2,0031
<i>tetA</i>	<i>sul2</i>	-	-	-	-
<i>tetA</i>	<i>sul3</i>	-	-	-	-
<i>tetC</i>	<i>sul1</i>	-	-	-	-
<i>tetC</i>	<i>sul3</i>	-	-	-	-
<i>strA/B</i>	<i>aadA1</i>	17,70	2,80–345,22	0,0097	2,8736
<i>strA/B</i>	<i>sul1</i>	-	-	-	-
<i>strA/B</i>	<i>sul2</i>	19	2,80–139,09	0,0023	2,9444
<i>aad A1</i>	<i>sul3</i>	12	3,60–48,40	0,0001	2,4849
<i>aad A1</i>	<i>dfrA1</i>	5,67	2,03–16,70	0,0011	1,7346
<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	9,50	1,09–68,11	0,0253	2,2513
<i>sul1</i>	<i>sul3</i>	-	-	-	-
<i>sul1</i>	<i>dfrA1</i>	18,53	2,75–367,92	0,0097	2,9194
<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	-	-	-	-
<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	6,89	1,24–52,68	0,0333	1,9299
<i>sul2</i>	<i>dfrA7</i>	39,50	3,17–968,40	0,0056	3,6763

Tabela 6. Opisowe porównanie korelacji występowania genów oporności u szczepów *E.coli* pochodzących od świń w trakcie antybiotykoterapii oraz po jej zakończeniu

Genotyp 1	Genotyp 2	Opisowa siła i wartość korelacji genotypów u szczepów <i>E.coli</i> od grup świń	
		Grupa I (antybiotyki +)	Grupa II (antybiotyki -)
<i>blaTEM</i>	<i>tetA</i>	-	0
<i>blaTEM</i>	<i>sul1</i>	0	++
<i>blaTEM</i>	<i>dfr1</i>	-	0
<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	0	-
<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	-	0
<i>tetA</i>	<i>aadA1</i>	+	+
<i>tetA</i>	<i>sul1</i>	+	+
<i>tetA</i>	<i>sul2</i>	+	0
<i>tetA</i>	<i>sul3</i>	-	0
<i>tetC</i>	<i>sul1</i>	-	0
<i>tetC</i>	<i>sul3</i>	++++	0
<i>strA/B</i>	<i>aadA1</i>	++	++
<i>strA/B</i>	<i>sul1</i>	+	0
<i>strA/B</i>	<i>sul2</i>	++++	++
<i>aadA1</i>	<i>sul3</i>	+	++
<i>aadA1</i>	<i>dfr1</i>	+	+
<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	0	+
<i>sul1</i>	<i>sul3</i>	-	0
<i>sul1</i>	<i>dfr1</i>	0	++
<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	-	0
<i>sul2</i>	<i>dfr1</i>	0	+
<i>sul2</i>	<i>dfr7</i>	0	+++

- korelacja negatywna, + OR(1-10), ++ OR (11-20); +++ OR (21-30); ++++ OR >31; 0- korelacja nieistotna statystycznie

4. DYSKUSJA

Pojawienie się oporności na wiele antybiotyków u bakterii powoduje poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, ponieważ dostępne środki przeciwbakteryjne stają się nieskuteczne w leczeniu infekcji [8]. W ścisłym znaczeniu tego słowa, organizmy wielolekooporne są określane ze względu na ich oporność *in vitro* na więcej niż jeden środek przeciwbakteryjny [15]. Cecha ta dotyczy nie tylko bakterii patogennych ale również komensalnych, które mogą powodować, w sprzyjających warunkach, infekcje lub przekazywać geny oporności innym bakteriom przyczyniając się w ten sposób do szerzenia oporności w środowisku [5, 10]. Istotne są więc różnorodne metody monitorowania wielolekooporności.

Wielolekooporność stwierdzono dla większości szczepów *E. coli* (96%) pochodzących od zwierząt, którym podawano antybiotyki. Po ustąpieniu presji antybiotykowej ilość szczepów wielolekoopornych utrzymywała się nadal na wysokim poziomie (60%). Oznacza to, że oporność na antybiotyki jest utrzymywana w populacji i sugeruje, że ograniczenie stosowania antybiotyków, nie eliminuje opornych klonów bakterii ze środowiska. Obserwacja ta potwierdza dane literaturowe, wskazujące na to, że zaprzestanie stosowania antybiotyków nie powoduje znacznego spadku w występowaniu szczepów opornych [7, 22]. Oporność jest warunkowana przez obecność genów oporności, które są pozyskiwane intensywnie ze środowiska kiedy pojawia się w nim antybiotyk. W badanych grupach zwierząt, rozpowszechnienie genów oporności u *E. coli* wskazuje, że część z tych genów nie jest tracona po ustaniu presji antybiotyku, chociaż z punktu widzenia metabolizmu komórkowego ich utrzymywanie w komórce, jest dodatkowym kosztem energetycznym. Zastosowanie analizy statystycznej ilorazu szans pozwoliło na określenie korelacji występujących pomiędzy genami oporności i obrazujących wspólne rozprzestrzenianie się tych genów w badanych zbiorach szczepów, co skutkuje ich wielolekoopornością. Analizując otrzymane wyniki, najczęściej stwierdzano dodatnią korelację genów oporności na streptomycynę z genami oporności na sulfonamidy, tetracykliny z sulfonamidami oraz sulfonamidów z trimetoprimem. Najmniej dodatnich korelacji wykazano dla genu oporności na ampicylinę (*bla_{TEM}*). Podczas antybiotykoterapii świniom podawano sulfonamid, trimetoprim i ampicylinę. Można byłoby się więc spodziewać, że podawanie tych antybiotyków wywoła silną dodatnią korelację pomiędzy genami warunkującymi oporność na te antybiotyki (*bla_{TEM} – sul1,2,3*, *bla_{TEM} – dfrA1,7*, *sul1,2,3 – dfrA1,7*). Jednak nie stwierdzono istotnie statystycznej korelacji tych genów w tej grupie zwierząt. Stwierdzono natomiast korelacje pomiędzy genami oporności na antybiotyki, których tym zwierzętom nie podawano - oporności na tetracyklinę oraz oporności na streptomycynę. Powyższe obserwacje wskazują, że presja ze strony antybiotyków nie generuje ścisłej oporności tylko na podawane antybiotyki, ale że uruchamiane są mechanizmy prowadzące do gromadzenia w komórce różnych genów oporności.

Asocjacje pomiędzy parami genów oraz siła korelacji genów oporności u *E. coli* pochodzących od zwierząt w trakcie antybiotykoterapii i po jej zakończeniu były różne. Dla części par genów stwierdzono dodatnie korelacje u szczepów pochodzących od obu grup świń, natomiast niektóre dodatnie korelacje występowały tylko u jednej grupy badanej. Dodatnie korelacje mogą być wynikiem wspólnej lokalizacji genów oporności na mobilnych elementach genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony i integrony, np. Johnson i współpracownicy badając związki pomiędzy wielolekoopornością a obecnością plazmidów u komensalnych *E. coli* od ludzi i drobiu, wykazali powiązanie pomiędzy określonymi wzorami wielolekooporności a występowaniem plazmidów typu IncA/C, IncP1- α , IncF, i IncII [11].

Korelacja pomiędzy genami oporności na tetracyklinę – *tetA*, *tetC* i genami oporności na sulfonamidy *sul2*, *sul3* oraz oporności na streptomycynę *strA/B* i sulfonami-

dy *sul1* występowała tylko u *E. coli* od świń w czasie presji antybiotykowej. Inne korelacje były istotne statystycznie tylko dla szczepów po ustaniu presji i dotyczyły genów oporności na sulfonamidy *sul1* i *sul2* z genami oporności na trimetoprim *dfr1* i *dfr7* oraz genu *sul1* z genem oporności na ampicylinę *bla_{TEM}*. Co ciekawe, dopiero po ustaniu presji antybiotykowej wyłoniła się grupa asocjacji genów związanych ściśle z antybiotykami, które podawano wcześniej zwierzętom.

Podobny stopień korelacji w przypadku obu analizowanych grup zwierząt stwierdzono dla par genów oporności na antybiotyki których nie podawano świnom: tetracykliny – *tetA* i streptomycyny – *aadA1* oraz genu *aadA1* z innym genem oporności na streptomycynę – *strA/B*. Może to świadczyć o tym, że geny te są stale obecne w klonach które zasiedlają badane grupy zwierząt. Obecność dwóch typów genów warunkujących oporność na streptomycynę w badanych szczepach może zapewniać wysoką oporność na ten antybiotyk u *E. coli*, a u obu grup zwierząt liczba szczepów opornych na streptomycynę była bardzo wysoka (odpowiednio 100% i 81%). Również Boerlin wykazał dodatnią asocjację dla dwóch genów oporności na streptomycynę jako wymóg wysokiego poziomu oporności na ten antybiotyk [1]. Natomiast korelacja genu oporności na tetracykliny *tetA* z genem oporności na streptomycynę *aadA1* może wynikać z wspólnej ich lokalizacji na jednym plazmidzie, który jest stabilny w komórce, nawet po ustąpieniu presji antybiotyku. Stabilność asocjacji po ustaniu presji wykazana została również dla genów *tetA – sul1*, *aadA1 – dfrA1*. Asocjacja genów *aadA1* i *dfrA1* sugeruje, że stanowią one kasety genowe wbudowane w zmienny fragment integronu klasy 1 (ruchomy element genetyczny) [21] a dodatkowo występowanie tej asocjacji w obu badanych grupach zwierząt wskazuje na stabilność tego integronu w badanych populacjach bakterii. W prezentowanych badaniach wartość ilorazu szans dla pary genów *strA/B* z *sul2* była najwyższa dla szczepów w obu grupach zwierząt, co sugeruje, że geny te znajdują się na jednym plazmidzie, który jest stabilny w komórkach bakteryjnych niezależnie od presji antybiotykowej. Kolejną asocjacją występującą wśród *E. coli* w obu badanych grupach, była korelacja genu *sul3* i *aadA1*. Analiza sekwencji DNA tych genów w oparciu o bazę danych NCBI, wskazuje, że gen *sul3*, wraz z genem *aadA1*, występuje w większości przypadków na mobilnych plazmidach (np. rodzinie plazmidów pRYC), i podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku analizowanych szczepów.

Niektóre korelacje były istotne statystycznie tylko dla szczepów po ustaniu presji. Dotyczyły genów oporności na sulfonamidy *sul1* i *sul2* z genami oporności na trimetoprim *dfrA1* i *dfrA7* oraz genu *sul1* z *bla_{TEM}*. Gen *sul1* jest identyfikowany prawie wyłącznie w integronach klasy 1 niesionych na dużych koniugacyjnych plazmidach [25], podobnie geny *dfrA1* i 7 stanowią często kasety genowe integronu tej kasy, co może stanowić uzasadnienie obserwowanej asocjacji genów. Dane literaturowe wskazują również, na lokalizację genu *sul2* na wielu dużych koniugacyjnych plazmidach, które są związane z występowaniem oporności na streptomycynę [25]. Powyższe ana-

lize mogą sugerować, że wśród *E. coli* badanej populacji krążą plazmidy koniugacyjne, niosące geny oporności.

W przypadku analizy korelacji genów oporności u *E. coli* od zwierząt w trakcie antybiotykoterapii stwierdzono występowanie licznych korelacji ujemnych. Jedną grupę stanowiły pary genów warunkujących oporność ten sam antybiotyk i dotyczyły oporności na sulfonamidy (*sul1* z *sul3*; *sul2* z *sul3*) oraz oporności na tetracyklinę (*tetA* i *tetC*), wskazując na wzajemne wykluczanie się obecności tych genów w komórkach bakterii. Drugą grupę stanowiły asocjacje genów warunkujących oporności na różne antybiotyki (*tetA* i *sul3*; *tetC* – *sul1* oraz *bla_{TEM}* i *tetA*, *bla_{TEM}* i *dfrAI*). Geny te leżą prawdopodobnie na plazmidach należących do tej samej grupy niezgodności, co oznacza brak ich współwystępowania w jednej komórce [11].

Porównując otrzymane korelacje z wynikami innych badaczy, można zauważyć podobieństwa oraz różnice w asocjujących genach. W badaniach korelacji genów oporności w zbiorze enterotoksycznych *E. coli* pochodzących od świń z Quebec (Kanada), Maynard i współpracownicy [17] wykazali dodatnią korelację genu *sul1* z genem *tetB*, oraz ujemną korelację z *tetA* i *tetC*. W naszych badaniach wystąpiła podobna ujemna korelacja genów *sul1* – *tetC* natomiast gen *sul1* był dodatnio zasocjowany z innym genem oporności na tetracyklinę – *tetA*. Zespół Maynarda wykazał również silną dodatnią korelację pomiędzy dwoma genami oporności na tetracyklinę *tetA* – *tetC*, która w naszych badaniach miała ujemną wartość. Inni autorzy [1, 12, 17] wykazali ujemną korelację genów *tetA* – *tetB*, wskazując na niezgodność plazmidów, które niosą te geny, przy czym w naszych badaniach, istotna statystycznie ujemna korelacja dla tych genów wystąpiła tylko u *E. coli* od świń po ustaniu kuracji antybiotykami. Boerlin i wsp. oraz Kozak w niezależnych badaniach określili korelacje dla genów oporności na streptomycynę, tetracykliny i sulfonamidy, u *E. coli* od świń z prowincji Ontario (Kanada) [1, 13], i większość z wykazanych przez nich korelacji pokrywa się w wynikami prezentowanymi w naszych badaniach, z wyjątkiem korelacji wykazanej w Ontario dla genu *tetB* z genami *aadA1*, *strA/B* oraz wykrytej w naszych badaniach korelacji genu *tetA* i *tetC* z genami oporności na sulfonamidy (*sul1*, *sul2*). Podobieństwa asocjujących par genów mogą wynikać z ich położenia na mobilnych elementach genetycznych, które są rozpowszechnione w różnych rejonach świata, natomiast różnice mogą wynikać z lokalnej ekspansji klonów *E. coli* opornych.

5. WNIOSKI

1. Analizy korelacji ilorazu szans są pomocne w szacowaniu współwystępowania genów oporności w szczepach bakterii wielolekoopornych.
2. Analiza ilorazu szans pozwoliła na określanie położenia badanych genów na mobilnych elementach genetycznych takich jak integrony i plazmidy.

3. Obserwowane różnice w wartościach ilorazu szans dla genów oporności na antybiotyki wśród bakterii u obu grup zwierząt pozwoliły na określenie, które geny oporności będą warunkowały oporność fenotypową utrzymującą się w badanej populacji bakterii niezależnie od występowania presji antybiotykowej.

4. Przeprowadzona analiza ilorazu szans, w porównaniu z danymi literaturowymi, pozwoliła wykazać, że pewne asocjacje genów oporności są rozpowszechnione w podobny sposób w różnych rejonach świata, natomiast inne wskazują na lokalny charakter rozpowszechnienia.

Badania zostały sfinansowane ze środków „Stypendium naukowego dla doktorantów kształcących się na kierunkach uznanych za szczególnie istotne z punktu rozwoju Województwa Lubuskiego” realizowanego w ramach Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2 „Transfer wiedzy”, Priorytetu VIII „Regionalne Kadry Gospodarki” Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu państwa i Województwa Lubuskiego.

LITERATURA

- [1] BOERLIN P., TRAVIS R., GYLES C., REID-SMITH R., JANECKO N., LIM H., NICHOLSON V., MCEWEN S., FRIENDSHIP R., ARCHAMBAULT M., *Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario*, Applied and Environmental Microbiology, 2005, Vol. 71, No. 11, 6753–6761.
- [2] BOK E., MAZUREK J., PUSZ P., STOSIK M., BALDY-CHUDZIK K., *Age as a factor influencing diversity of commensal E.coli microflora in pigs*. Polish Journal of Microbiology, 2013, Vol. 62, No. 2, 165–171.
- [3] BUCZEK K., MARĆ M., *Antybiotykooporność bakterii – przyczyny i skutki*. Annales Universitatis Mariae Curie– Skłodowska Lublin– Polonia, 2009, VOL. LXIV (3).
- [4] CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard–Eleventh Edition. CLSI document M02-A11, 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [5] COSTA P.M., LOUREIRO L., MATOS A., *Transfer of Multidrug- Resistant Bacteria Between Intermingled Ecological Niches: The Interface Between Humans, Animals and the Environment*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, No. 10, 278–294.
- [6] EFSA. *European Food Safety Authority approaches to risk assessment in the area of antimicrobial resistance with an emphasis on commensal microorganisms*, EFSA Journal, 2011, Vol. 9, No. 10, 196.
- [7] GILLESPIE S.H., *Antibiotic resistance in the absence of selective pressure*, International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, Vol. 17, No. 3, 171–6.
- [8] GOOTZ T.D., *The global problem of antibiotic resistance*, Critical Reviews in Immunology, 2010, Vol. 30, No. 1, 79–93.
- [9] GRIMES DA., SCHULZ KF., *Making sense of odds and odds ratios*, Obstetrics & Gynecology, 2008, No. 111, 423–6.
- [10] HAMMERUM A., HEUER O., *Human health hazards from antimicrobial-resistant Escherichia coli of animal origin*, Clinical Infectious Diseases, 2009, Vol. 48, No. 7, 916–921.

- [11] JOHNSON T.J., LOGUE C.M., JOHNSON J.R., KUSKOWSKI M.A., SHERWOOD J.S., BARNES H.J., DEBROY C., WANNEMUEHLER Y.M., OBATA-YASUOKA M., SPANJAARD L., NOLAN L.K., *Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal Escherichia coli from humans and poultry, 2012*, Foodborne Pathogens and Diseases, Vol. 9, No. 1, 37-46.
- [12] KANWAR N., SCOTT H.M., NORBY B., LONERAGAN G.H., VINASCO J., MCGOWAN M., COTTELL J.L., CHENGAPPA M.M., BAI J., BOERLIN P., *Effects of Ceftiofur and Chlortetracycline Treatment Strategies on Antimicrobial Susceptibility and on tet(A), tet(B), and bla CMY-2 Resistance Genes among E. coli Isolated from the Feces of Feedlot Cattle*, 2013, PLoS One, Vol. 8, Issue 11: e80575.
- [13] KOZAK G., BOERLIN P., JANECKO N., REID-SMITH R.J., JARDINE C., *Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada*, Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75, 559-566.
- [14] KRUSE H., SORUM H., *Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments*, Applied and Environmental Microbiology, 1994, Vol. 60, No. 11, 4015-4021.
- [15] MAGIORAKOS A-P., SRINIVASAN A., CAREY R. B. ET AL., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clinical Microbiology and Infection, 2012, Vol. 18, 268-281.
- [16] MARSHALL B., LEVY S., *Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health*, Clinical microbiology reviews, 2011, Vol. 24, No. 4, 718-733.
- [17] MAYNARD CH., FAIRBROTHER J., BEKAL S., SANSCHAGRIN F., LEVESQUE R, BROUSSEAU R., MASSON L., LARIVIERE S., HAREL J., *Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic Escherichia coli O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, Vol. 47, No. 10, 3214-3221.
- [18] MAZUREK J., PUSZ P., BOK E., STOSIK M., BALDY-CHUDZIK K., *The phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance in Escherichia coli populations isolated from farm animals with different exposure to antimicrobial agents*, Polish Journal of Microbiology, 2013, Vol. 62, No. 2, 173-179.
- [19] MORTEN O. SOMMER A., DANTAS G., CHURCH G. M., *Functional characterization of the antibiotic resistance Reservoir in the human microflora*, 2009, Science, Vol. 325, 1128- 1131.
- [20] SIMON S.D., *Understanding the Odds Ratio and the Relative Risk*, Journal of Andrology, 2001, Vol. 22, No. 4.
- [21] STALDER T., BARRAUD O., CASELLAS M., DAGOT C., PLOY M.C. *Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance*, Frontiers in Microbiology, 2012, Vol. 3, 119.
- [22] SUNDQVIST M., GELI P., ANDERSSON D.I., SJOLUND-KARLSSON M., RUNEHAGEN A., *Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, Vol. 65, No. 2, 350-60.
- [23] SZYMANEK K., *Zależność cech. Przedział ufności dla ilorazu szans*, <http://www.szymanek.org/>
- [24] VERRAES C., VAN BOXSTAELE S., VAN MEERVENNE E., VAN COILLIE E., BUTAYE P, CATRY B., DE SCHAETZEN M. VAN HUFFEL X., IMBERECHTS H., DIERICK K., DAUBE G., SAEGERMAN C., DE BLOCK J, DEWULF J., HERMAN J. *Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, Vol. 10, 2643-2669.
- [25] WU S., DALSGAARD A., HAMMERUM A., PORSBO L.J., JENSEN L.B., *Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among Escherichia coli from pigs, pig carcasses and human*, Acta Veterinaria Scandinavica, 2010, Vol. 52:47.

APPLICATION OF ODDS RATIO STATISTICAL ANALYSIS IN THE STUDIES
OF MULTIPLE DRUG RESISTANCE.

The present study concerned the use of odds ratio statistical analysis to determine the probability of coexistence of specific antibiotic resistance genes in multidrug resistant commensal *Escherichia coli*. The research material consisted strains from two groups of pigs, treated with antibiotics, and 2.5 months after treatment. *E. coli* were tested for their sensitivity to antibiotics from eight classes and the presence of resistance genes was detected. Among the isolates from both groups of animals high percentages of multidrug resistance were found, and the prevalence of different ampicillin (*bla_{TEM}*), tetracycline (*tetB*, *C*, *D*), streptomycin (*strA/B*, *aadA1*), sulfonamides (*sul1,2,3*) and trimethoprim (*dfrA1,7*) resistance genes was detected. The positive correlation has been show for 9 pairs of genes in *E. coli* from pigs during antibiotics treatment, and for 11 pairs of genes in *E. coli* from pigs after cessation of antibiotic administration. Also pairs of negative correlation were detected. There were differences between pairs of genes which revealed association and in the strength of genes association within the *E. coli* from two groups of animals. Odds ratio analysis allowed to estimate the location of tested genes on mobile genetic elements such as plasmids and integrons and an indication of the genes determining multidrug resistance in *E. coli* after the cessation of antibiotic pressure in the studied groups of animals.