

Łukasz JAŁOWIECKI, Joanna CHOJNIAK, Grażyna PŁAZA*

ANALIZA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI W BAKTERYJNYCH SZCZEPACH ŚRODOWISKOWYCH

Nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków zarówno w medycynie, rolnictwie czy weterynarii skutkuje pojawieniem i rozprzestrzenianiem się oporności szczepów bakterii na antybiotyki. Wyróżnia się dwa rodzaje oporności, wrodzoną i nabytą. Oporność wrodzona to naturalna cecha danego gatunku lub grupy bakterii, która nie niesie ze sobą ryzyka przeniesienia oporności na inny gatunek. Oporność nabyta występuje u początkowo niewrażliwych na dany chemioterapeutyków szczepów, które na skutek mutacji nabyły cech oporności. Do najważniejszych mechanizmów oporności bakterii zaliczana jest modyfikacja miejsca docelowego działania antybiotyku, enzymatyczna hydroliza leków, zmiana przepuszczalności osłon komórkowych, wykształcenie alternatywnej drogi z pominięciem etapu wrażliwego na działanie antybiotyku czy aktywne usuwanie substancji czynnych z komórek za pomocą pomp np. MDR. Jednym z najważniejszych etapów diagnostyki mikrobiologicznej jest oznaczenie oporności na leki, w tym antybiotyki. W artykule scharakteryzowano wybrane metody identyfikacji oporności, od prostych testów fenotypowych do bardziej skomplikowanych metod, wykorzystujących techniki biologii molekularnej, stosowane w diagnostyce lekoopornych szczepów bakteryjnych.

1. WSTĘP

Konsumpcja antybiotyków, zarówno w leczeniu szpitalnym jak i otwartym, systematycznie wzrasta. W 1997 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła narastający problem antybiotykooporności do grupy największych zagrożeń w dziedzinie zdrowia publicznego [8]. Niewłaściwe i nadmierne stosowanie antybiotyków jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za powstawanie i rozprzestrzenianie się mechanizmów oporności drobnoustrojów [2, 14]. Antybiotyki stosowane są nie tylko w medycynie, ale również w rolnictwie, hodowli zwierząt i weterynarii. Zawie-

* Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Mikrobiologia Środowiskowa, ul. Kossutha 6, 40-844 Katowice, jalowiecki@ietu.katowice.pl.

siną antybiotyków opylane są również owoce. Presja selekcyjna antybiotyków przyspiesza rozwój antybiotykooporności również w środowisku. Dwie główne drogi rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów to odpady biologiczne powstające w rolnictwie i bezpośrednia (kontakt zwierząt i ludzi, np. hodowców zwierząt) lub pośrednia droga przenoszenia patogenów ze zwierząt na ludzi (spożycie skażonego mięsa). W Polsce monitorowanie stosowania antybiotyków w różnych dziedzinach życia odbywa się w ramach Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków utworzonego w 2004 roku [1, 4].

Oporność rozpatrywana jest na poziomie genotypowym, fenotypowym, pochodzenia i typu bakterii. Brak jednak jednoznacznej definicji określającej niewrażliwość mikroorganizmów na czynniki antybakteryjne. Jedna z nich, opracowana jest Europejską Agencją do Oceny Produktów Medycznych wyróżnia oporność mikrobiologiczną, w której jako odporne definiowane są mikroorganizmy posiadające jakiegokolwiek mechanizmy oporności lub geny warunkujące oporność. Drugi typ oporności to oporność kliniczna, w której miarą lekooporności jest brak lub wystąpienie reakcji danej bakterii na zadaną terapię [4, 5, 9].

2. ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ

2.1. ODPOWIEDŹ MIKROORGANIZMÓW NA ANTYBIOTYKI

Wyróżnia się dwa typy antybiotykooporności, wrodzoną (ang. *intrinsic*) i nabytą (ang. *acquired*). Oporność wrodzona jest naturalną cechą szczepu lub gatunku i nie stanowi ryzyka w przenoszeniu oporności na inne bakterie. Przykładem oporności wrodzonej jest niewrażliwość pałeczek Gram-ujemnych na działanie makrolidów oraz penicyliny G czy oporność bakterii beztlenowych na aminoglikozydy. Oporność wrodzona nie oznacza jednak całkowitego braku reakcji na dany antybiotyk. W przypadku pałeczek Gram-ujemnych niewrażliwych na penicylinę obserwowana jest zmiana kształtu i wielkości pałeczek, które przechodzą w tzw. formy L [5, 15, 19].

Oporność nabyta występuje u organizmów, które początkowo były wrażliwe na dany antybiotyk, ale na skutek zmian zachodzących w genomie, głównie w wyniku mutacji spontanicznych, nabyły cech oporności. Jednym z najważniejszych mechanizmów nabywania antybiotykooporności jest horyzontalny transfer genów. Geny warunkujące oporność, w procesach koniugacji, transdukcji i transformacji, mogą zostać przekazane antybiotykowrażliwym szczepom. Do mobilnych elementów zawierających geny oporności należą plazmidy, integrony i transpozony. Wertykalne przeniesienie genów oznacza dziedziczenie niewrażliwości przez potomne klony bakterii [18].

Innym typem reakcji bakterii na zastosowany antybiotyk jest tzw. tolerancja wobec leku. W tym typie odpowiedzi bakterie nie rosną i nie dzielą się, a wartość CFU (jednostka tworzenia kolonii; CFU – ang. *colony forming unit*) w wysiewach nie spada. W wyniku długotrwałego kontaktu mikroorganizmów z antybiotykiem pewna część populacji, zwykle mniejsza niż 0,1%, zdolna do przeżycia odpowiada za tzw. zjawisko przetrwania. Ważnym zjawiskiem jest również efekt poantybiotykowy (PAE – ang. *post-antibiotic effect*), który polega na zahamowaniu wzrostu bakterii w wyniku krótkotrwałego stosowania antybiotyku. Efekt PAE utrzymuje się zwykle tylko przez kilka godzin i jest częstym źródłem nieprawidłowego dawkowania antybiotyków [4, 10].

2.2. MECHANIZMY ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Antybiotykooporność drobnoustrojów uwarunkowana jest kilkoma głównymi mechanizmami. Do najczęściej występujących zaliczyć możemy modyfikację miejsca docelowego (ang. *target*) antybiotyku, m.in. białek rybosomalnych, co skutkuje zahamowaniem procesów translacji. Rozwojem oporności skutkuje również modyfikacja prekursorów mureiny czy podjednostek gyrazy. Drugim najważniejszym mechanizmem warunkującym antybiotykooporność jest enzymatyczna inaktywacja leków, np. hydroliza wiązania C-N w pierścieniu β -laktamowym cefalosporyn czy inaktywacja erytromycyny przez esterazy. Epidemia lekooporności w znacznym stopniu obniżyła użyteczność terapeutyczną β -laktamów, dotychczas uważanych za jedną z najbezpieczniejszych grup antybiotyków [10, 11]. Kolejnym mechanizmem uniemożliwiającym działanie terapeutyczne leków jest zmiana przepuszczalności błon komórkowych bakterii. Zmiany obejmują m.in. pogrubienie warstwy mureinowej czy modyfikację struktury i liczby poryn. Mechanizm ten determinuje oporność na wankomycynę, gdzie w mureinie alanina ulega zmianie na mleczan [10, 19]. Bardzo ważnym mechanizmem warunkującym lekooporność jest zjawisko „efflux”, polegające na aktywnym usuwaniu antybiotyków z komórki dzięki aktywności pomp błonowych. Pompy charakteryzują się zróżnicowanym zakresem substratowym i specyficznością. Przykładem antybiotyków usuwanych dzięki syni antyporterom lub dzięki energii uzyskanej z hydrolizy wysokoenergetycznych wiązań ATP są tetracykliny [6]. Oporność mikroorganizmu na dany antybiotyk lub grupę antybiotyków może być również wynikiem działania systemu dwuskładnikowego, czyli modyfikacji w systemach regulacyjnych niezaangażowanych bezpośrednio w działanie antybiotyku powszechnie występujących w komórkach bakteryjnych. Na rozwój lekooporności wpływa również zmniejszenie poziomu aktywności enzymów (np. reduktazy nitrofuranowej) katalizującej przejście nieczynnej formy antybiotyku do formy aktywnej wewnątrz komórki. Pozostałe strategie zmniejszające wrażliwość na chemioterapeutyki to m.in. zwiększanie stężenia antagonistów inhibitora czy zmniejszenie potrzeb mikroorganizmu na produkt szlaku hamowanego przez antybiotyk. Ważnym mechani-

zmem determinującym oporność jest również reakcja „by-pass” polegająca na wykształceniu innej drogi umożliwiającej ominięcie etapu wrażliwego na lek, np. alternatywne szlaki metaboliczne syntezy kwasu diaminopimelinowego [10].

3. METODY OCENY ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Wzrastające zużycie antybiotyków i rozprzestrzenianie się zjawiska lekooporności bakterii wymaga opracowania i wprowadzenia standaryzowanych procedur określających oporność mikroorganizmów na chemioterapeutyki. Oznaczenie lekowrażliwości szczepów jest podstawą opracowywania skutecznej terapii, ograniczającej nadmierne lub niewłaściwe stosowanie leków. Analiza antybiotykooporności obejmuje metody hodowlane i molekularne, które niezależnie od zastosowanego testu powinny charakteryzować się czułością, swoistością i powtarzalnością [5, 17]. Podział wybranych metod przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Metody analizy antybiotykooporności

Lp.	Metody hodowlane	Metody molekularne
1.	Krażki dyfuzyjne	Reakcja PCR
2.	E-Testy	PCR-RFLP
3.	Biolog® System (płytki PM 11,12,13,14)	RT-PCR
4.	Metoda mikrorozcieńczeń	Sekwencjonowanie Sangera
5.		Western Blot
6.		Mikromacierze

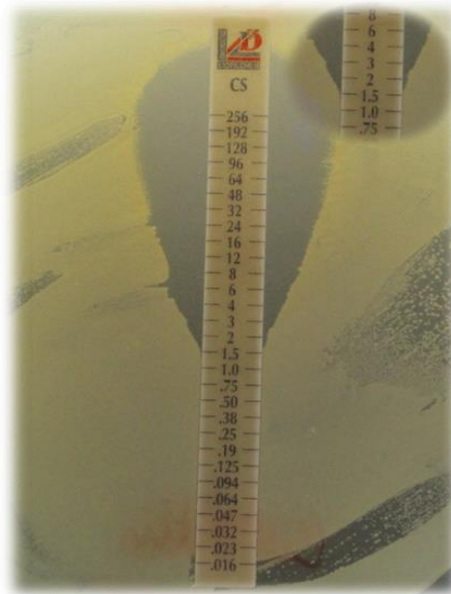
3.1. WYBRANE METODY HODOWLANE

Podstawową i jedną z najczęściej stosowanych metod jakościowych jest metoda dyfuzyjno-krażkowa zwana również metodą Kirby-Bauera. W metodzie tej miarą antybiotykowrażliwości jest strefa zahamowania wzrostu danego mikroorganizmu, wyrażona w milimetrach, wokół krążka nasączonego antybiotykiem umieszczonego na podłożu stałym z zawiesiną bakterii o określonej gęstości. Substancja czynna antybiotyku dyfunduje promieniście, co skutkuje powstaniem stref zahamowania wzrostu zgodnych z gradientem stężeń. Wielkość strefy jest wprost proporcjonalna do wrażliwości drobnoustroju na daną substancję, które na podstawie wielkości strefy i przyjętych standardów określa się jako odporne, średniowrażliwe i wrażliwe. Czynniki mające istotny wpływ na wynik testu to przede wszystkim wartość pH pożywki oraz gęstość inokulum. Optymalna wartość pH podłoża stosowanych do oceny oporności powinna wynosić ok. 7,2–7,4. Niższe pH skutkuje utratą aktywności antybiotyków np. makrolidów i chinolonów (fałszywa oporność) lub zwiększoną aktywność tetracyklin

(fałszywa wrażliwość). Fałszywie pozytywne lub negatywne wyniki mogą być spowodowane również zbyt małą lub dużą gęstością inokulum. Optymalny czas inkubacji szacowany jest na 16–18 godz., optymalna temperatura inkubacji wynosi 35 °C. Czynniki limitujące metodę krążków dyfuzyjnych w oczywisty sposób zależą również od stężenia antybiotyków w krążkach, rozmiaru zastosowanych płytek i grubości warstwy agaru. Najważniejsze ograniczenia metody dyfuzyjno-krążkowej dotyczą jej zastosowania w przypadku bakterii wolnorosnących i bezwzględnych bakterii beztlenowych [3, 13].

Drugą metodą określania oporności drobnoustrojów na antybiotyki są metody rozcieńczeniowe, pozwalające na określenie MIC (MIC- ang. *minimal inhibitory concentration*), czyli minimalnego stężenia hamującego danego antybiotyku. Identyfikację wieloopornych szczepów bakterii (MDR- ang. *multidrug resistance*) i wyznaczenie wartości MIC możliwe jest m.in. dzięki zastosowaniu systemu BIOLOG[®]. W systemie tym płytki o sygnaturze PM11-PM14 i oprogramowania Omnilog umożliwiają określenie wrażliwości szczepów bakterii na kilkadziesiąt chemioterapeutyków [7].

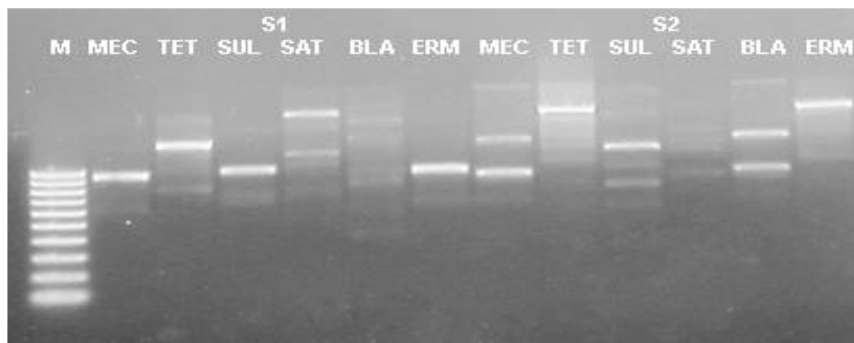
Połączeniem metody krążków dyfuzyjnych i metody rozcieńczeniowej jest metoda tzw. E-testów, opracowana w Szwecji. E-testy w postaci plastikowych pasków zawierających gradient stężenia antybiotyku umieszcza się na podłożu agarowym z wysianą zawiesiną bakteryjną o znanej gęstości. Ilościowe określenie MIC możliwe jest dzięki wyznaczeniu miejsca przecięcia strefy zahamowania wzrostu ze skalą umieszczoną po drugiej stronie E-testu (rys. 1) [3].



Rys. 1. Ilościowe określenie MIC za pomocą E- testu (badania własne)

3.2. WYBRANE METODY MOLEKULARNE

Metody molekularne wykorzystywane w diagnostyce lekooporności mikroorganizmów umożliwiają wykrycie zmian zachodzących zarówno na poziomie DNA, RNA oraz produktu ekspresji genów. Do najważniejszych metod opartych na analizie DNA zaliczana jest reakcja PCR, stosowana najczęściej w przypadku, gdy znany jest mechanizm determinujący lekooporność. Pozostałe metody pozwalające na identyfikację zmian na poziomie DNA to najczęściej modyfikacje standardowej reakcji PCR (rys. 2). Przesiewowym testem opartym na właściwościach DNA jest metoda polimorfizmu konformacyjnego pojedynczych nici PCR-SSCP (PCR-SSCP – ang. *single strand conformational polymorphism*), w której produkty reakcji PCR poddawane są denaturacji, a następnie przenoszone do środowiska niedenaturującego. W środowisku tym prawidłowe nici DNA przyjmują inną konformację niż nici zmutowane. Ocena ekspresji w reakcji PCR-SSCP powinna zostać poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji [9, 21].



Rys. 2. Rozkład elektroforetyczny po amplifikacji genów oporności na antybiotyki (badania własne)
M-marker wielkości 1000-100kpz, MEC-metacylina, TET- tetracyklina, SUL- sulfonamid SAT- gentamycyna, BLA- β -laktamy, ERM- erytromycyna, S1,S2- szczepy bakterii

Kolejną techniką stosowaną do oceny lekooporności jest polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (PCR-RFLP – ang. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*). W technice tej amplifikowany fragment DNA poddaje się trawieniu enzymem restrykcyjnym. Jeśli w analizowanym fragmencie zaszła mutacja punktowa, w obrazie elektroforetycznym możliwe będzie wyróżnienie lekoopornych szczepów. Siłę dyskryminacyjną elektroforezy można zwiększyć poprzez zastosowanie zmiennego pola elektrycznego (PFGE - ang. *pulse-field gel electrophoresis*).

Kolejną techniką umożliwiającą identyfikację antybiotykoopornych szczepów jest dideoksy sekwencjonowanie, czyli sekwencjonowanie Sangera. Dideoksy nukleotydy nie posiadają grupy –OH w pozycji 3' deoksyrybozy, co uniemożliwia przyłączenie kolejnego nukleotydu do nowosyntetyzowanej nici DNA. Otrzymane fragmenty będą się więc różnić o 1 nukleotyd. Następnie, produkty reakcji rozdzielane są w żelach poliakrylamidowych.

Ocena fragmentów dokonywana jest za pomocą automatycznych sekwenatorów, które wyposażone są w detektor fluorescencji [9, 16].

Do oceny ekspresji RNA najczęściej stosowanymi technikami jest reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (RT-PCR – ang. *reversed-transcriptase PCR*) i reakcja PCR w czasie rzeczywistym qPCR (qPCR – ang. *quantitative PCR*). W pierwszej reakcji komplementarne DNA (cDNA) syntetyzowane jest przy udziale enzymu odwrotnej transkryptazy na matrycy mRNA. Najczęściej stosowanym starterem jest starter oligo dT, komplementarny do ogona poliA, dodawanego do końca 3' każdego pre-mRNA. Zsyntetyzowane cDNA poddawane są standardowej reakcji PCR, a interpretacja obrazu elektroforetycznego pozwala na identyfikację genów oporności. Reakcja qPCR wykorzystywana jest do ilościowej interpretacji ekspresji RNA. Monitorowanie przyrostu ilości kopii analizowanej sekwencji umożliwia zastosowanie wyznakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych lub barwników fluorescencyjnych takich jak niespecyficzny SYBR Green interkalujący między zasady DNA, bromek etydyny czy jodek propidyny. Do jednych z najczęściej stosowanych sond należą sondy typu *TaqMan*, czyli krótkie oligonukleotydy, wyznakowane dwoma fluorochromami, reporterem na 3' końcu (np. FAM, NED) oraz wygaszaczem na końcu 5' (najczęściej TAMRA). Odległość między reporterem a wygaszaczem umożliwia przekazanie energii między fluorochromami. Sonda, po związaniu z komplementarną sekwencją na etapie elongacji degradowana jest przez polimerazę *Taq* posiadającą aktywność 5'-egzonukleazy, co umożliwia emisję światła. Innym rodzajem sond stosowanych do oceny ekspresji RNA są oligonukleotydy typu Molecular Beacons, gdzie do wygaszenia fluorescencji używane są cząsteczki nie będące fluorochromem, np. przy braku sekwencji wiążącej sonda poprzez komplementarne końce 3 i 5' tworzy strukturę tzw. spinki do włosów i nie emituje światła. Po związaniu z rozpoznawaną sekwencją dochodzi do linearyzacji sondy, co umożliwia emisję światła przez cząsteczkę reportera [16, 21].

Najważniejsze metody pozwalające na identyfikację lekoopornych szczepów na poziomie produkcji białka to Western Blot i mikromacierze (ang. *microarrays*). W technice Western Blot (immunoblotting) białka poddane elektroforezie w żelach poliakrylamidowych z dodatkiem siarczanu dodecyłu sodu (SDS), nadającego białkom ujemny ładunek, transferowane są na membranę, np. nitrocelulozową. Następnie, białka poddaje się inkubacji z przeciwciałem (metoda bezpośrednia). W metodzie pośredniej białka inkubowane są z dwoma rodzajami przeciwciał, swoistym przeciwciałem I-rzędu i wyznakowanym przeciwciałem II-rzędu. Przeciwciała II-rzędowe mogą być znakowane radioaktywnie, najczęściej jednak są one połączone z enzymem, np. z peroksydazą chrzanową (HRP) lub fosfatazą alkaliczną (AP), co pozwala na przeprowadzenie reakcji barwnej [12].

Mikromacierze, w postaci szklanych płytek, membran lub szkiełek, pozwalają na analizę molekularnych sond w postaci 25–60 oligonukleotydowych (ang. *oligo array*) lub jednoniciowych cDNA (ang. *cDNA array*). Zasadą mikromacierzy jest hybrydyzacja komplementarnych, wyznakowanych fluorochromami analizowanych sekwencji,

a odpowiednią sondą molekularną umieszczoną na mikropłytkce. Wyróżnia się kilka rodzajów mikropłytek, pozwalających, m.in. na identyfikację jednonukleotydowych polimorfizmów w DNA lub ocenę ekspresji genów na poziomie transkrypcji. Mikro-macierze pozwalają na ocenę ekspresji jakościowo, półilościowo lub ilościowo tysięcy genów jednocześnie.

Badania są realizowane w ramach projektu pt.: "Optimization of small wastewater treatment facilities (OPTITREAT)" nr 2112932-1 finansowanego przez BONUS EEIG.

LITERATURA

- [1] BARTOSZEWICZ M., MICHALSKA M., CIESZYŃSKA M., *Antybiotykooporność bakterii heterotroficznych jako skutek zanieczyszczenia środowiska*, Environmental Medicine, 2014, Vol. 17, No. 4, 38–46.
- [2] BOECKEL T., GANDRA S., ASHOK A., CAUDRON Q., GRENFELL B., LEVIN S., LAXMINARAYAN R., *Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data*, The Lancet, 2014, Vol. 14, 742–750.
- [3] BOROWSKA D., JABŁOŃSKI A., PEJSAK Z., *Metoda krążkowo-dyfuzyjna w weterynaryjnej diagnostyce bakteriologicznej – praktyczne dane*, Życie Weterynaryjne, 2014, Vol. 89, No. 2, 116–120.
- [4] BUCZEK K., MARĆ M., *Antybiotykooporność bakterii – przyczyny i skutki*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, 2009, Vol. 56, No. 3, 1–8.
- [5] CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W., ZADERNOWSKA A., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł., *Fenotypowa i genotypowa oporność na antybiotyki szczepów z rodzaju Enterococcus izolowanych z żywności gotowej do spożycia fenotypowa i genotypowa oporność na antybiotyki szczepów z rodzaju Enterococcus izolowanych z żywności gotowej do spożycia*, Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, Kraków 2015, 25–34.
- [6] CHOJECKA A., JAKUBIEC K., JAKIMIĄK B., RÖHM-RODOWALD E., KANCLERSKI K., *Znaczenie zjawiska efflux jako mechanizmu oporności bakterii na substancje czynne środków dezynfekcyjnych*, Przeglądy Epidemiologiczne, 2012, Vol. 66, 39–44.
- [7] CHOJNIĄK J., JAŁOWIECKI Ł., DORGELOH E., HEGEDUSOVA B., EJHED H., MAGNÉR J., PŁAZA G., *Application of the BIOLOG system for characterization of Serratia marcescens ss marcescens isolated from onsite wastewater technology (OSWT)*, Acta Biochimica Polonica, 2015, Vol. 62, No. 4, 799–805.
- [8] EGGLESTON K., ZHANG R., ZECKHAUSER R., *The Global Challenge of Antimicrobial Resistance: Insights from Economic Analysis*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, Vol. 7, 3141–3149.
- [9] GUERRA B., JUNKER E., SCHROETER A., MALORNY B., LEHMANN S., HELMUTH R., *Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German Escherichia coli isolates from cattle, swine and poultry*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, Vol. 52, 489–492.
- [10] KWIATKOWSKI Z., MARKIEWICZ Z., *Bakterie Antybiotyki Lekooporność*, PWN, Warszawa 2015.
- [11] KÜMMERER K., *Resistance in the environment*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, Vol. 54, 311–320.

- [12] OPIELA J., *Analiza ekspresji genów na poziomie białek przy użyciu techniki western-blot*, Wiadomości Zootechniczne, 2006, Vol. XLIV, 11–13.
- [13] PŁAZA P., TUREK A., SZCZYGŁOWSKA R., *Characterization of E. coli strains obtained from wastewater effluent* International Journal of Environmental Research, 2013, Vol. 2, No. 3, 67–73.
- [14] RZEPKOWSKA A., ZIELIŃSKA A., KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA D., *Antybiotykooporność bakterii z rodzaju Lactobacillus pochodzących z żywności, jako kryterium stawiane probiotykom*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 2014, Vol. 578, 99–110.
- [15] SOSA A., BYARUGABA D., AMABILE C., HSUEH P., KARIUKI S., OKEKE I., *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*, Hardcover, 2010, Vol. XXIII, 15–26.
- [16] SUNDSFJORD A., SIMONSEN G., HALDORSEN B., HAAHEIM H., HJELMEVOLL S., LITTAUER P., DAHL K., *Genetic methods for detection of antimicrobial resistance*, Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2004, Vol. 112, 815–37.
- [17] SZCZYPA K., WILEMSKA J., HRYNIEWICZ W., SITKIEWICZ I., *Epidemiologia zakażeń Streptococcus pyogenes, struktura klonalna populacji i antybiotykooporność*, Postępy Mikrobiologii, 2013, Vol. 52, No. 3, 223–232.
- [18] TRUSZCZYŃSKI M., PEJSAK Z., *Dynamika rozwoju antybiotykooporności bakterii odzwierzęcych*, Życie Weterynaryjne, 2013, Vol. 88, No. 7, 535–538.
- [19] WASAŻNIK A., GRINHOLC M., BIELAWSKI K., *Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, 2009, Vol. 63, 123–133.
- [20] WASYL D., OSEK J., *Monitorowanie występowania oporności na antybiotyki u szczepów Salmonella i Campylobacter izolowanych od zwierząt*, Życie Weterynaryjne, 2008, Vol. 83, No. 2, 107–109.
- [21] ŻEBROWSKA M., SAŁAGACKA A., MIROWSKI M., BALCERCZAK E., *Techniki molekularne wykorzystywane w diagnostyce lekooporności związanej z transporterami nadrodziny ABC*, Journal of Laboratory Diagnostics, 2011, Vol. 47, No. 2, 205–209.

METHODS FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENVIRONMENTAL BACTERIA

Excessive and inappropriate use of antibiotic both in medicine and agriculture results in the appearance and spread of antibiotic-resistant bacteria. We can distinguished two types of resistance, intrinsic and acquired. First of them is a natural feature of a strains or group of bacteria, which does not carry the risk of transfer of resistance genes to other bacterial species. Acquired resistance occurs in initially resistance species which due to the mutations acquired resistance features. The most important mechanisms responsible for resistance of bacteria to antibiotics include: modification of antibiotic target, enzymatic hydrolysis of drugs, changes in membrane permeability, formation of an alternative metabolic pathways without step sensitive to antibiotic and presence of transporters involved in active extrusion of antibiotics from within cells to into the external environment. Analysis of multidrug resistance bacteria include both culture and molecular methods. In this paper short characteristics of selected methods used in diagnosis of multidrug resistance bacteria are presented.