

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ
KATEDRA EpIZOOTIOLOGII z KLINIKĄ PTAKÓW I ZWIERZĄT EGZOTYCZNYCH

Lek. wet. Daria Płókarz

**Epidemiologia zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* w
populacji psów i kotów na terenie miasta Wrocławia.**

**Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs and cats
population in Wrocław city area.**

Praca Doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:

prof. dr hab. Krzysztof Rypuła

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 2023

STRESZCZENIE

Pseudomonas aeruginosa to Gram-ujemna, tlenowa, nietworząca przetrwalników pałeczka. Jej szerokie rozpowszechnienie w środowisku powoduje zagrożenie zarówno dla zdrowia publicznego jak i zdrowia zwierząt. Może być przenoszona zarówno w kontakcie bezpośrednim jak i poprzez skontaminowane powierzchnie oraz sprzęt. *P. aeruginosa* jest bakterią oportunistyczną, która zdolna jest do wywoływania zakażeń zarówno miejscowych jak i tych o charakterze uogólnionym. Chorobotwórczość *P. aeruginosa* wynika z jego licznych mechanizmów zjadliwości.

W niniejszym badaniu wykorzystano 271 szczepów *P. aeruginosa* pochodzących od psów (n=212) i kotów (n=59). Materiał badawczy izolowany był od psów z zewnętrznego kanału słuchowego, układu oddechowego oraz skóry: - u kotów natomiast: z jamy nosowej, zewnętrznego kanału słuchowego i skóry. Głównym celem badań była ocena klinicznych szczepów *P. aeruginosa* pod względem antybiotykooporności, zdolności do produkcji biofilmu oraz obecności wybranych genów wirulencji, które podzielono na 3 grupy: geny związane z produkcją biofilmu (*pelA*, *pslA*, *ppyR*, *fliC* i *nanI*), geny odpowiedzialne za produkcję toksyn (*toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exo*) oraz geny odpowiedzialne za produkcję enzymów (*plcH*, *plcN*, *lasB*). Dane zostały poddane analizie statystycznej pod względem związków i współzależności prezentowanych czynników wirulencji przy użyciu programu TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Antybiotykooporność została oznaczona przy pomocy metody Kirby-Bauera. Hodowla biofilmu prowadzona była przy użyciu metody płytek mikrotitracyjnych (MTP), natomiast identyfikacja genów wirulencji przeprowadzona została przy pomocy reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Największy odsetek szczepów opornych został stwierdzony w klasie fluorochinolonów w zakresie od 17,3% w przypadku ciprofloksacyny do 83% w przypadku enrofloksacyny.

Oporność w klasie karbapenemów sięgała natomiast od 4,8% dla meropenemu do 14% dla imipenemu. Prawie wszystkie szczepy *P. aeruginosa* posiadały geny *exoT* (97,8%) i *lasB* (93,4%), podczas gdy najniższa prevalencja została stwierdzona dla genu *exoU* (17,3%) i *plcH* (17,3%). Szczepy pochodzące od psów, które posiadały gen *toxA* znacząco częściej były odporne na ceftazydym ($p=0,012$), podczas gdy izolaty posiadające gen *exoU* wykazywały znacząco częściej oporność na marbofloksacynę ($p=0,025$) i amikacynę ($p=0,056$). Szczepy pochodzących od kotów, które posiadały gen *exoU* znacząco częściej były odporne na enrofloksacynę ($p=0,054$). Zdolność do tworzenia biofilmu stwierdzono u 90,6% izolatów od psów i 86,4% izolatów pochodzących od kotów. W szczepach *P. aeruginosa* pozyskanych od psów i kotów najczęściej stwierdzano gen *ppyR* (97,2% u psów i 98,3% u kotów), następnie odpowiednio: *pslA* (60,8% i 57,6%), *fliC* (60,4% i 69,5%), *nanI* (45,3% i 44,1%) i *pelA* (40,1% i 33,9%). U psów szczepy *P. aeruginosa* formujące biofilm istotnie częściej niż nieposiadające tej zdolności wykazywały obecność genu *fliC* ($p = 0.015$). Natomiast w przypadku szczepów od kotów izolaty formujące biofilm istotnie częściej nie posiadały genu *nanI* ($p = 0,017$).

W ostatnich latach obserwuje się wzrost znaczenia *P. aeruginosa* jako przyczyny trudnych do wyleczenia zakażeń u zwierząt, co stało się przesłanką dla prezentowanej pracy.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative, aerobic, non-spore forming bacillus. Widespread in the environment causes risk for animals and human health. Can be transmitted through both direct contact and contaminated surfaces and equipment. This pathogen is an opportunistic microorganism of dogs and cats able to cause both local and systemic infections. This bacterium is widespread in the environment, resistant to unfavorable conditions, and may spread between humans and other mammals. Its pathogenicity and transmission is based on various virulence factors.

In this epidemiological study, 271 *P. aeruginosa* strains (212 from dogs and 59 from cats) were investigated. All animals had clinical symptoms of *P. aeruginosa* infection. In dogs, the strains were isolated from the external auditory canal, respiratory tract, and skin. In cats, the strains were isolated from the nasal cavity, external auditory canal, and skin. The main goal of the research was to screen *P. aeruginosa* strains for antibiotic resistance, biofilm forming ability and the presence of selected virulence factor genes divided to three groups: genes involved in biofilm formation (*pelA*, *pslA*, *ppyR*, *fliC* and *nanI*), genes involved in toxin production (*toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoS*) and others virulence related genes (*plcH*, *plcN*, *lasB*). Obtained results were compared between species. The data was analysed in terms of relationship and interdependence using TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA).

Antibiotic resistance was determined using the Kirby–Bauer method, for biofilm production microtiter plate method (MTP) was used, while virulence genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). The most frequently detected resistance was to fluoroquinolones, ranging in prevalence from 17.3% for ciprofloxacin up to 83% for enrofloxacin. The resistance to carbapenems was 14% and 4.8% for imipenem and meropenem, respectively.

Almost all *P. aeruginosa* strains harboured the *exoT* (97.8%) and *lasB* (93.4%) genes, while the lowest prevalence was found for *exoU* (17.3%) and *plcH* (17.3%). *P. aeruginosa* strains isolated from dogs that harboured the *toxA* gene were more frequently resistant to ceftazidime ($p=0.012$), while the presence of the *exoU* gene was found to be connected with resistance to marbofloxacin ($p=0.025$) and amikacin ($p=0.056$). In strains originating from cats, only the connection between the presence of the *exoU* gene and resistance to enrofloxacin ($p=0.054$) was observed. Biofilm-forming ability was detected in 90.6% of isolates in dogs and 86.4% of isolates in cats. In *P. aeruginosa* isolates from both species, the most prevalent virulence factor gene was *ppyR* (97.2% in dogs and 98.3% in cats), followed by *pslA* (60.8% and 57.6%), *fliC* (60.4% and 69.5%), *nan1* (45.3% and 44.1%), and *pelA* (40.1% and 33.9%, respectively). In dogs, a significantly higher proportion of biofilm-forming *P. aeruginosa* strains possessed the *fliC* gene compared to non-biofilm-forming strains ($p = 0.015$). In cats, a significantly lower proportion of biofilm-forming strains had the *nan1* gene compared to non-biofilm-forming strains ($p = 0.017$).

P. aeruginosa has assumed an increasingly prominent role as the aetiological agent in serious hard-to-treat infections in animals, which has become an inspiration to create this study.