

## STRESZCZENIE

Oporność bakterii na substancje przeciwdrobnoustrojowe jest uznawana za jedno z największych zagrożeń zdrowia publicznego. Choć jest to zjawisko naturalne, to do jego rozpowszechnienia przyczynia się przede wszystkim nadmierne stosowanie substancji przeciwbakteryjnych w medycynie, weterynarii i rolnictwie. Dynamika rozprzestrzeniania oporności powoduje, że coraz bardziej realna staje się wizja braku możliwości skutecznego leczenia zakażeń bakteryjnych.

Mając na względzie skalę zjawiska oporności oraz ścisłe zależności między człowiekiem, zwierzętami i środowiskiem, a także z uwagi na fakt, że bakterie odzwierzęce stanowią istotny czynnik etiologiczny wielu zakażeń ludzi, niezbędne jest poznanie roli różnych populacji zwierząt w rozprzestrzenianiu bakterii opornych.

Krokiem w tym przedsięwzięciu są badania wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Celem badań była charakterystyka zjawiska oporności bakteryjnej flory jelitowej wybranych gatunków zwierząt oraz ocena przydatności metod molekularnych w monitorowaniu oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe.

Ważnym aspektem pracy było zastosowanie molekularnych metod diagnostycznych opartych na sekwencjonowaniu wysokoprzepustowym. Przeprowadzona analiza sekwencji genomowych szczepów bakteryjnych pochodzących od zwierząt umożliwiła porównanie puli determinant oporności badanych szczepów z ich fenotypowym profilem oporności. Co więcej, pozwoliła określić związki epidemiologiczne szczepów, zidentyfikować geny patogenności oraz plazmidy uczestniczące w horyzontalnym transferze genów, a także określić rolę klonalnego szerzenia się mechanizmów oporności. Ponadto, zastosowanie metody niezależnej od hodowli – sekwencjonowania całkowitego DNA izolowanego z treści jelit oraz identyfikacji poszczególnych determinant oporności w całym mikrobiomie, umożliwiło kompleksową ocenę zjawiska, nieograniczoną do pojedynczych izolatów bakteryjnych. Takie podejście dało sposobność holistycznego spojrzenia na problem oraz pozwoliło scharakteryzować i porównać rezystomy jelitowe różnych gatunków zwierząt.

Badania przedstawione w niniejszej dysertacji objęły 356 próbek pobranych w latach 2016 – 2020 od zwierząt: gryzoni, ptaków wolno żyjących, dzików, lisów oraz zwierząt hodowlanych.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że bakteryjna flora jelitowa zwierząt stanowi rezerwuuar licznych determinant oporności, niemniej dowiedziono występowania różnic w skali oporności mikrobiomu jelitowego badanych gatunków zwierząt.

Wykazano niewielkie znaczenie wolno żyjących gryzoni w szerzeniu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Zdecydowana większość *E. coli* izolowanych od gryzoni była wrażliwa na wszystkie badane substancje przeciwbakteryjne. Oporność stwierdzono zaledwie w przypadku kilku szczepów opornych na kolistynę lub tetracyklinę. Pomimo niskiego statusu oporności bakterie pochodzące z tej populacji zwierząt mogą stanowić źródło nieznanych dotąd determinant oporności. Izolacja szczepów wykazujących fenotypową oporność na kolistynę, u których nie zidentyfikowano żadnego mechanizmu oporności, wskazuje na potrzebę dalszych analiz w celu charakterystyki podstaw genetycznych tego fenomenu. Zastosowanie technologii WGS pozwoliło uzyskać dodatkowe informacje na temat różnorodności filogenetycznej i struktury populacji *E. coli* u wolno żyjących gryzoni. Wyniki potwierdziły, że pomimo rzadko obserwowanej oporności, bakterie te stanowią rezerwar licznych czynników wirulencji.

Zdecydowanie większą skalę oporności stwierdzono u *E. coli* pochodzących od wolno żyjących ptaków. Występowanie determinant warunkujących oporność również na substancje przeciwbakteryjne o najwyższym priorytecie w leczeniu zakażeń u ludzi m.in. betalaktamów, cefalosporyn, chinolonów, makrolidów, czy aminoglikozydów potwierdza, że ptaki wolno żyjące stanowią znaczący rezerwar i wektor opornych bakterii. Pośród licznych determinant stwierdzono obecność m.in. genów *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1*, *qnrB19*, *mcr-1*, *fosA7*, *aac(3)-IIa*, *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* oraz chromosomalnych mutacji w regionach determinujących oporność na chinolony *gyrA*, *parC* i *parE*.

Przedstawione analizy filogenetyczne *E. coli* pochodzących od ptaków wykazały, że występowanie określonych kombinacji genów, jak i mutacji w regionach determinujących oporność było powiązane z określonymi typami sekwencyjnymi. Wskazuje to na możliwość klonalnego szerzenia się specyficznych mechanizmów oporności. Co więcej, uzyskane wyniki potwierdziły obecność determinant oporności i czynników wirulencji u szczepów reprezentujących klinicznie ważne typy sekwencyjne np. ST131, ST10 i ST224.

Badania dotyczące całkowitego mikrobiomu jelitowego pozwoliły na porównanie statusu oporności zwierząt podlegających w środowisku różnej ekspozycji na środki przeciwdrobnoustrojowe. Analizy objęły zwierzęta hodowlane (kury, indyki i świnie) przypuszczalnie narażone na działanie tych substancji, a także zwierzęta wolno żyjące (dziki, lisy i gryzonie) prawdopodobnie wolne od bezpośredniej antybiotykowej presji selekcyjnej. W mikrobiomach jelitowych badanych zwierząt zidentyfikowano 117 różnych klastrów reprezentujących geny oporności. Najliczniej występowały geny kodujące oporność na tetracykliny, makrolidy, aminoglikozydy i betalaktamy.

Uzyskane wyniki potwierdziły większą różnorodność genów oporności i wyższą skalę oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w mikrobiomie jelitowym gatunków hodowlanych w porównaniu z wolno żyjącymi, wskazując na stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w sektorze produkcji zwierzęcej jako głównego czynnika przyczyniającego się do pojawiania oporności w bakteryjnej florze zwierząt. W mikrobiomach gatunków hodowlanych stwierdzono występowanie m.in. *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(40)*, *tet(X)*, *mef(A)*, *erm(B)*, *erm(F)*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *cfxA6*, *cfxA*, *bla<sub>TEM</sub>*, *cfr(C)*.

Badania wykazały również potencjał zwierząt wolno żyjących, zwłaszcza lisów i dzików w szerzeniu antybiotykooporności. W mikrobiomie tych gatunków wykryto obecność genów kodujących oporność na substancje o krytycznym znaczeniu z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego m.in. cefalosporyny, chinolony, aminoglikozydy, makrolidy. Zidentyfikowano również liczne plazmidy przyczyniające się do rozprzestrzeniania się oporności.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej dysertacji przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat epidemiologii oporności u zwierząt. Badania umożliwiły poznanie roli różnych gatunków zwierząt w rozprzestrzenianiu opornych bakterii. Ponadto pozwoliły wykazać przydatność metod molekularnych w monitoringu oporności. W przeciwieństwie do metod fenotypowych, które zwykle obejmują ograniczoną ilość badanych substancji przeciwbakteryjnych, wykorzystane w badaniach metody oparte na sekwencjonowaniu umożliwiły identyfikację całego profilu determinant warunkujących oporność. Zrealizowane badania wykazały jednocześnie szereg obszarów wymagających dalszych analiz.

## **SUMMARY**

Antimicrobial resistance of bacteria is recognized as one of the greatest threats to public health. Although it is a natural phenomenon, its dissemination is mainly caused by the excessive use of antibacterial substances in medicine, veterinary and agriculture. Due to the resistance spread dynamics, the vision of the lack of effective treatment of bacterial infections becomes more and more realistic.

Considering the scale of the resistance phenomenon and the close relations between humans, animals and the environment, as well as the fact that zoonotic bacteria remain an important etiological factor of many human infections, it is essential to understand the role of different animal populations in the dissemination of resistant bacteria.

The research carried out as part of this doctoral dissertation is a step toward this purpose. The aim of the current study was to characterize the phenomenon of resistance of intestinal bacterial flora in selected animal species and to evaluate the usefulness of molecular methods in antimicrobial resistance monitoring.

An important aspect of the work was the application of diagnostic methods based on high-throughput sequencing. The analysis of genome sequences of bacterial strains derived from animals allowed for the comparison of the resistance determinants pool of tested strains with their phenotypic resistance profiles.

Furthermore, it enabled the determination of the epidemiological relationships of the strains, identification of pathogenicity genes and plasmids involved in the horizontal gene transfer as well as to determine the role of the clonal spread of resistance mechanisms. In addition, the use of a culture-independent method – sequencing of total DNA isolated from intestinal content and the identification of individual resistance determinants in the entire microbiome, allowed for a comprehensive evaluation of the phenomenon, not limited to single bacterial isolates. This approach provided an opportunity for a holistic view of the problem and the characterization and comparison of intestinal resistomes of different animal species.

The studies presented in the current work included 356 samples collected between 2016 – 2020 from animals like: rodents, free-living birds, wild boars, foxes, and farm animals.

The obtained results confirmed that the intestinal bacterial flora of animals constitutes a reservoir of numerous resistance determinants, nevertheless, differences in the scale of resistance in the animal species included in the study were demonstrated.

Free-living rodents have been shown to play a minor role in antimicrobial resistance spreading. The vast majority of *E. coli* isolated from rodents were susceptible to all tested antimicrobials. Only a few strains were resistant to colistin or tetracycline. Despite the low resistance status, bacteria from this animal population may be a source of yet unknown resistance determinants. The isolation of strains with phenotypic resistance to colistin, with no resistance mechanism identified, indicates the need for further study to elucidate the genetic basis of this phenomenon. The use of WGS technology has provided additional information on the phylogenetic diversity and structure of *E. coli* population in free-living rodents. The results confirmed that despite the rarely observed resistance these bacteria constitute a reservoir of numerous virulence factors.

A substantially higher degree of resistance was found in *E. coli* from free-living birds. The presence of resistance determinants also towards antimicrobials of the highest priority in the treatment of human infections, including beta-lactams, cephalosporins, quinolones, macrolides, and aminoglycosides confirms that free-living birds constitute a significant reservoir and vector of resistant bacteria. Among numerous resistance determinants: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *aac*(6')-Ib-cr, *qnrS1*, *qnrB19*, *mcr-1*, *fosA7*, *aac*(3)-IIa, *ant*(3'')-Ia, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id as well as chromosomal mutations in the regions determining quinolone resistance *gyrA*, *parC*, and *parE* were found.

The presented phylogeny of *E. coli* deriving from birds showed that the occurrence of specific resistance gene combinations and mutations in regions determining quinolone resistance was associated with certain sequence types. The observation suggests that particular resistance mechanisms could spread clonally. Moreover, results confirmed the existence of resistance determinants and virulence factors in strains representing clinically significant sequence types, e.g. ST131, ST10 and ST224.

The studies on the total gut microbiome allowed for the comparison of the resistance status of animals exposed to various antimicrobial pressure in the environment. The analyses included farm animals (chickens, turkeys and pigs) probably subjected to these substances and free-living animals (wild boar, foxes and rodents) possibly free from direct antibiotic selective pressure. Up to 117 different clusters representing resistance genes were identified in the gut

microbiome of the tested animals. The genes encoding resistance to tetracyclines, macrolides, aminoglycosides and beta-lactams were the most abundant.

The obtained results confirmed a greater diversity of resistance genes and a larger scale of antimicrobial resistance in the gut microbiome of farmed species in comparison to the free-living ones, pointing at the use of antimicrobials in the livestock sector as a primary factor for the emergence of resistance in the bacterial flora of animals. In the microbiome of farmed species, the occurrence of, i.e., *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(40)*, *tet(X)*, *mef(A)*, *erm(B)*, *erm(F)*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *cfxA6*, *cfxA*, *bla<sub>TEM</sub>*, *cfr(C)* were noted.

The studies have also shown the potential of free-living animals, especially foxes and wild boars, to resistance spread. The presence of genes encoding resistance to substances critically important for public health, including cephalosporins, quinolones, aminoglycosides, macrolides were found in the microbiome of these species. Numerous plasmids contributing to the spread of resistance were identified as well.

The results obtained within this dissertation have contributed to broadening the knowledge about the epidemiology of resistance in animals. The studies highlighted the role of different animal species in the spread of resistant bacteria. Furthermore, the conducted research allowed for the demonstration of the efficacy of molecular methods in resistance monitoring. Unlike phenotypic methods, which usually include a limited amount of tested antimicrobial compounds, the sequencing-based methods used in this work identified the entire profile of resistance determinants. Nevertheless, the current study indicates several areas for further research on the resistance phenomenon.