

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

mgr inż. Marcelina Anna Osińska

Występowanie, charakterystyka molekularna i fenotypowa wielolekoopornych szczepów
Escherichia coli izolowanych od zwierząt wolno żyjących
(Occurrence, molecular and phenotypic characteristics of multi-drug resistant *Escherichia coli*
strains isolated from free-living animals)

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Badania były częściowo finansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców numer grantu: WKD/MN-1/19.

Mojej Promotorce – Pani prof. dr hab. Anecie Nowakiewicz, składam serdeczne podziękowania za niezmierną życzliwość, bezcenne wskazówki i wszechstronną pomoc w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam wszystkim Pracownikom Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, dziękuję za okazałą pomoc i miłą atmosferę oraz wszystkim Osobom, których wiedza i życzliwość przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

Najbliższym dziękuję za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość, a niniejszą rozprawę dedykuję Synowi Aleksandrowi.

Spis treści

Streszczenie.....	5
Summary	8
1. Wstęp	10
1.1 Charakterystyka bakterii <i>Escherichia coli</i>	10
1.2 Charakterystyka wybranych patotypów <i>E. coli</i>	11
1.2.1 Szczepy entropatogenne (EPEC)	11
1.2.2 Szczepy enterotoksyczne (ETEC).....	11
1.2.3 Szczepy Shigatoksyczne (STEC).....	12
1.2.4 Szczepy <i>E. coli</i> powodujące infekcje pozajelitowe (ExPEC).....	12
1.3 Lekooporność <i>Escherichia coli</i>	13
2. Uzasadnienie i cele pracy.....	17
3. Materiał i metody.....	19
3.1 Materiał biologiczny.....	19
3.2 Podstawa prawna prowadzonych badań:	19
3.3 Metodyka	21
3.3.1 Izolacja szczepów <i>E. coli</i>	21
3.3.2 Wstępne określenie fenotypowych profili oporności – metoda dyfuzyjno krążkowa (ang. DDM, disc diffusion method)	21
3.3.3 Określenie fenotypowych profili oporności za pomocą metody mikrorozcieńczeń 22	
3.3.4 Analiza występowania genów oporności	22
3.3.5 Analiza genów wirulencji.....	26
3.3.6 Typowanie molekularne w oparciu o całkowite genomowe DNA z wykorzystaniem metody ADSRRS fingerprinting – Amplifikacja fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne	26

3.3.7	Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów (ang. multilocus sequence typing, MLST).....	28
4.	Wyniki.....	31
4.1	Izolacja i identyfikacja szczepów	31
4.2	Różnicowanie z wykorzystaniem techniki ADSRRS-fingerprinting	31
4.3	Określenie minimalnego stężenia hamującego.....	34
4.4	Występowanie genów oporności	35
4.5	Występowanie genów wirulencji.....	38
4.6	Analiza typów sekwencyjnych w oparciu o technikę MLST	38
5.	Dyskusja.....	40
6.	Wnioski	58
7.	Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:	59
8.	Piśmiennictwo.....	60

Streszczenie

Escherichia coli (*E. coli*) jest naturalnym komponentem mikrobioty ludzi i zwierząt oraz występuje powszechnie w środowisku bytowania człowieka i zwierząt. Niektóre szczepy wykształciły również wiele cech i przystosowań do wywoływania infekcji jelitowych lub pozajelitowych u gospodarza. W literaturze krajowej i zagranicznej występuje wiele prac dotyczących oporności bakterii *E. coli* na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe. Najlepiej poznaną pod względem oporności jest grupa zwierząt gospodarskich objętych obligatoryjnymi monitoringami oporności. Opublikowano również kilka prac badawczych w Polsce, dotyczących oporności *E. coli* izolowanej od zwierząt towarzyszących, które poprzez bliski kontakt mogą w łatwy sposób przenosić bakterie lekooporne również na człowieka.

Kolejną szczególnie interesującą grupą badawczą wydają się być zwierzęta wolno żyjące. Zwierzęta wolno żyjące jako nie poddawane terapii celowanej z założenia powinny być nosicielami niższego odsetka szczepów opornych na leki i wskazywać realne odwzorowanie poziomu lekooporności występującego w środowisku. Z drugiej strony, we współczesnym środowisku występuje wiele gatunków zwierząt o wysokim potencjale synantropizacji. Gatunki takie jak lis rudy, kuna domowa czy norka coraz częściej podchodzą do gospodarstw i siedzib człowieka celem znalezienia łatwo dostępnych źródeł pożywienia. W ten sposób zwierzęta te mogą przyczynić się do przenoszenia mikroorganizmów opornych na leki wśród pozostałych grup zwierząt, człowieka i środowiska. W Polsce dane dotyczące występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u *E. coli* izolowanej od zwierząt wolno żyjących są jak do tej pory ograniczone. Wynika to prawdopodobnie przede wszystkim z trudności w dostępności do materiału badawczego.

Niniejsza praca dotyczy wielopoziomowej analizy zjawiska lekooporności szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących. Realizując badania, poszczególne gatunki zwierząt analizowano w aspekcie przeważającego typu diety, która w zależności od poziomu zróżnicowania może wpływać na poziom lekooporności badanych szczepów; oddzielnie przebadano poziom lekooporności szczepów pochodzących od zwierząt mięsożernych oraz zwierząt wszystkożernych i roślinożernych. Oddzielną grupą badawczą były izolaty o fenotypie oporności na cefalosporyny trzeciej generacji (ang. cephalosporin resistant CR). W pracy zastosowano unikatowe podejście do etapu izolacji szczepów wykorzystujące kombinacje czterech podłoży i zwiększające prawdopodobieństwo otrzymania

kilku szczepów opornych na co najmniej jeden lek z pojedynczej próby. Różnicowanie szczepów przeprowadzono na poziomie fenotypowym badając oporność szczepów oraz genotypowym analizując profile genomowe uzyskanych izolatów. Za pomocą metod biologii molekularnej przeprowadzono analizę występowania genetycznych determinant oporności i szerokiego panelu genów związanych z wirulencją. W wybranych izolatach (szczepy odporne na cefalosporyny CR) określono także typy sekwencyjne szczepów *E. coli*.

Zastosowanie kilku podłoży do izolacji szczepów pozwoliło uzyskać izolaty z 71,6% próbek pochodzących od zwierząt mięsożernych i z 50,9% próbek od zwierząt wszystkożernych i roślinożernych opornych na co najmniej jedną substancję przeciwbakteryjną. Wyizolowane szczepy wykazywały znaczną różnorodność zarówno pod względem fenotypu oporności jak i profili genomowych. Wstępne zastosowanie metody dyfuzyjno-krażkowej celem wykluczenia tych samych izolatów z danej próbki (ryzyko przeszacowania wyników) pozwoliło na eliminację zaledwie 13 szczepów. Natomiast profile genomowe izolatów otrzymane przy użyciu metody ADSRRS-fingerprinting, różniły się zarówno pod względem liczby uzyskanych prążków (od 5 do 19), jak i wielkością uzyskanych fragmentów.

Badane szczepy *E. coli* cechowały się wiodącą opornością na ampicylinę (98,3%), tetracyklinę (69,7%) oraz sulfametoksazol (52,6%). We wszystkich grupach badawczych uzyskano podobny udział szczepów wielolekoopornych (oporność na co najmniej trzy substancje przeciwbakteryjne, należące do różnych grup) wynoszący około 70%. Oporność na ciprofloksacynę wykazano u 24% izolatów, jednakże największy ich udział został odnotowany u szczepów opornych na cefalosporyny. Oporność fenotypowa została potwierdzona występowaniem genetycznych determinant oporności głównie następujących genów: *tetA* (u szczepów opornych na tetracyklinę) i *sul2* (u szczepów opornych na sulfametoksazol). Najczęściej występującymi genami warunkującymi oporność na fluorochinolony, przenoszoną na drodze horyzontalnej wymiany (ang. PMQR, plasmid mediated quinolone resistance), były *qnrS*, *qnrB* i *aac(6')-Ib*. Szczepy odporne na cefalosporyny charakteryzowały się wytwarzaniem zróżnicowanego panelu nabytych β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ang. extended spectrum beta lactamase, ESBL) i cefalosporynaz (AmpC). Fenotyp ten wynikał najczęściej z ekspresji genów *bla_{CMY-2}* oraz genów z grupy *bla_{CTX-M-1}* i z grupy *bla_{CTX-M-9}*.

Analiza genów wirulencji wykazała występowanie najczęściej szczepów wywołujących infekcje pozajelitowe (ExPEC) oraz pojedyncze szczepy o patotypie ETEC (ang.

enterotoxigenic *E. coli*) i EHEC (ang. enterohemorrhagic *E. coli*). Najczęściej występującymi typami sekwencyjnymi wśród badanych szczepów *E. coli* były te, które należały do kompleksów klonalnych: 10, 155, 23 i 69.

Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność badania zwierząt wolno żyjących jako potencjalnego rezerwuaru szczepów *E. coli* opornych na powszechnie stosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe. Badania wykazały pozytywną zależność pomiędzy opornością na cefalosporyny i występowaniem genów PMQR. Nie wykazano również zależności pomiędzy występowaniem fenotypu wielolekoopornego i wirulentnego wśród badanych izolatów *E. coli*.

Summary

Escherichia coli (*E. coli*) is a natural component of the human and animal microbiota and is ubiquitous in the environment of humans and animals. Some strains have also developed many traits and adaptations to cause intestinal or extraintestinal infections in the host. In domestic and foreign literature, there are many studies on the resistance of *E. coli* bacteria to commonly used antimicrobial agents. A group of livestock animals that is best known for resistance is the group of animals subject to obligatory resistance monitoring. Several research papers have been published in Poland on the resistance of *E. coli* isolated from companion animals, which can easily transfer drug-resistant bacteria to humans through close contact.

Free-living animals seem to be another particularly interesting research group. Since they do not undergo targeted therapy, free-living animals should by definition be carriers of a lower percentage of drug-resistant strains and show a realistic representation of the level of drug resistance in the environment. On the other hand, in the modern environment, there are many animal species with high synanthropization potential. Such species as the red fox, beech marten, or mink increasingly often approach farms and human households to find easily accessible sources of food. In this way, these animals can contribute to the transfer of drug-resistant microorganisms to other groups of animals, humans, and the environment. In Poland, data on the occurrence of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from free-living animals are so far limited. This is probably related mainly to the difficulties in accessing research material.

This work is a multi-level analysis of drug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from free-living animals. In carrying out the research, individual species of animals were analyzed in terms of the predominant type of diet, which, depending on the level of differentiation, may affect the level of drug resistance of the tested strains. The level of drug resistance of strains from carnivores, omnivores, and herbivores was tested separately. A separate research group were isolates with the phenotype of resistance to third generation cephalosporins (cephalosporin resistant CR). The study was conducted with a unique approach to the isolation stage of strains using combinations of four media and increasing the probability of detection of several strains resistant to at least one drug from a single trial. Strain differentiation was carried out at the phenotypic level by examining the resistance of the strains and at the genotypic level by analyzing the genomic profiles of the obtained isolates. The occurrence of genetic determinants of resistance and a wide panel of genes related to virulence were analyzed using molecular

biology methods. Sequence types of *E. coli* strains were also determined in selected isolates (cephalosporin-resistant strains CR).

The use of several media for isolation of the strains yielded strains from 71.6% of samples from carnivores and from 50.9% of samples from omnivores and herbivores resistant to at least one antibacterial substance. The isolated strains showed great diversity in terms of both the resistance phenotype and genomic profiles. The initial application of the disc diffusion method to exclude the same isolates from a given sample (risk of overestimation of the results) allowed elimination of only 13 strains. In turn, the genomic profiles of isolates obtained using the ADSRRS-fingerprinting method differed in terms of both the number of bands (from 5 to 19) and the size of the fragments obtained.

The tested *E. coli* strains showed leading resistance to ampicillin (98.3%), tetracycline (69.7%), and sulfamethoxazole (52.6%). In all research groups, a similar proportion of multi-drug-resistant strains (resistance to at least three antibacterial substances from different groups) was obtained, amounting to approximately 70%. Resistance to ciprofloxacin was demonstrated in 24% of isolates; however, the highest share was noted in strains resistant to cephalosporins. Phenotypic resistance has been confirmed by the presence of genetic determinants of resistance mainly of the *tetA* (in tetracycline-resistant strains) and *sul2* (in sulfamethoxazole-resistant strains) genes. The most common genes determining plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) resistance were *qnrS*, *qnrB*, and *aac(6')-Ib*. Cephalosporin-resistant strains were characterized by the production of a diverse panel of acquired broad-spectrum beta lactamases (ESBL) and cephalosporinases (AmpC). This phenotype was most often associated with the expression of the *bla_{CMY-2}* genes as well as the *bla_{CTX-M-1}* and *bla_{CTX-M-9}* genes.

The analysis of virulence genes revealed the most common presence of strains causing extraintestinal infections (ExPEC) and single strains with the ETEC (enterotoxigenic *E. coli*) and EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*) pathotype. The most common sequence types among the studied *E. coli* strains were those belonging to the clonal complexes: 10, 155, 23, and 69.

The obtained results confirm the necessity to study free-living animals as a potential reservoir of *E. coli* strains resistant to commonly used antimicrobial substances. The investigations have shown a positive relationship between cephalosporin resistance and the presence of PMQR genes. There was also no correlation between the presence of the multi-drug-resistant and virulent phenotype among the *E. coli* isolates studied.

1. Wstęp

1.1 Charakterystyka bakterii *Escherichia coli*

Escherichia coli (pałeczka okrężnicy) kolonizuje przewód pokarmowy ludzi oraz zwierząt już w kilka chwil po narodzinach (Katouli, 2010). Bakteria ta jest składnikiem naturalnej mikrobioty i jako komensal uczestniczy w licznych procesach fizjologicznych, m. in. takich jak rozkład substancji pokarmowych, utrzymanie homeostazy organizmu oraz produkcja witamin. Komensaliczne szczepy *E. coli* rzadko wywołują chorobę, najczęściej u gospodarzy z obniżoną odpornością organizmu lub w przypadku naruszenia naturalnych barier żołądkowo-jelitowych lub zaburzenia równowagi mikrobioty jelitowej (Braz i wsp., 2020).

Pod względem cech morfologicznych *Escherichia coli* jest krótką prostą, Gram-ujemną i fakultatywnie beztlenową pałeczką. Komórki *E. coli* mają zazwyczaj 1,1-1,5 µm szerokości i 2-6 µm długości. Najważniejszymi cechami biochemicznymi brany pod uwagę przy izolacji i identyfikacji pałeczki okrężnicy, jest zdolność do fermentowania laktozy z wydzieleniem gazu i rozkładu tryptofanu do indolu (Leclercq i wsp., 2001).

Wśród szczepów *E. coli* istnieją także klony wysoce wyspecjalizowane, które poprzez nabycie specyficznych cech wirulencji zwiększyły swoją zdolność do adaptacji nowych nisz i mogą wywoływać szerokie spektrum chorób (Gyles i Boerlin, 2014). Szczepy posiadające specyficzne kombinacje czynników wirulencji określane są patotypami zdolnymi do wywoływania chorób u osobników zdrowych. Zakażenie jednym z patotypów może wywołać jeden z trzech ogólnych zespołów klinicznych: infekcje dróg moczowych (ZUM), biegunkę/chorobę jelit lub zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych/posocznicę (Kaper i wsp., 2004). Szczepy wywołujące infekcje jelitowe należą do 7 głównych patotypów: enterotoksyczne (ETEC), enteropatogenne (EPEC), shigatoksyczne (STEC), enteroagregacyjne (EAEC), enteroinwazyjne (EIEC), adherentno-inwazyjne (AIEC) oraz o rozsianym typie adhezji (DAEC) szczepy *E. coli* (Półtorak i wsp., 2016). Szczepy wywołujące zakażenia pozajelitowe określane są szczepami ExPEC. U człowieka najczęściej izolowane są uropatogenne *E. coli* (UPEC) odpowiedzialne za zakażenia układu moczowego oraz szczepy *E. coli* związane z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych (NMEC). U zwierząt najbardziej rozpowszechniony jest patotyp APEC tzw. ptasi patogeny szczep *E. coli* wywołujący infekcje dróg oddechowych (Kaper i wsp., 2004).

1.2 Charakterystyka wybranych patotypów *E. coli*

1.2.1 Szczepy enteropatogenne (EPEC)

Szczepy enteropatogenne są najlepiej poznaną grupą patogennych *E. coli*. W wyniku przyłączenia się do komórek nabłonka jelita wywołują w organizmie gospodarza wodniste lub krwawe biegunki. Szczepy EPEC tworzą charakterystyczne zmiany histopatologiczne. Na skutek tak zwanego przylegania i zacierania (attaching and effacing, A/E) struktury kosmków jelitowych dochodzi do kontaktu z enterocytami, zniszczenia rąbka szczoteczkowego w miejscu przylegania, a następnie do uszkodzenia cytoszkieletu komórek gospodarza. Szczepy EPEC wytwarzają białka BFP (bundle-forming pilus), których działanie prowadzi do tworzenia mikrokolonii na powierzchni nabłonka nazywanych zlokalizowaną adhezją (L/A). Za wytwarzanie specyficznych czynników wirulencji odpowiedzialny jest chromosomalny fragment DNA nazywany „locus of enterocyte effacement” (LEE). W tym regionie zlokalizowany jest gen *eae*, którego ekspresja prowadzi do wytwarzania białka błony zewnętrznej – intyminy. Intymina w sposób bezpośredni odpowiada za uszkodzenia cytoszkieletu komórek gospodarza. W regionie LEE występują także geny uczestniczące w wytwarzaniu elementów strukturalnych uczestniczących w systemie sekrecji typu III. Ponadto w regionie LEE są geny kodujące białka efektorowe i receptor Tir (translocated intimin receptor), które pełnią rolę w adhezji szczepów enteropatogennych do nabłonka i powstawaniu zmian (Mare i wsp., 2021; Kaper i wsp., 2004; Półtorak i wsp., 2016).

1.2.2 Szczepy enterotoksyczne (ETEC)

Enterotoksyczne szczepy *E. coli* wywołują wodnistą biegunkę, skurcze mięśni brzucha, nudności i nieznacznie podwyższoną temperaturę ciała. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do adhezji do nabłonka jelita dzięki działaniu czynników CF (Colonization Factors) i wytwarzaniem specyficznych toksyn. Jednym z najważniejszych czynników patogenności jest ciepłochwiejna enterotoksyna LT. Poprzez jej działanie rośnie stężenie cAMP i nadmiernego wydzielania wody i elektrolitów do światła jelita. Kolejnym markerem zjadliwości jest ciepłostała toksyna ST, występująca w wariacie STa i STb. Toksyna STa jest wykrywana głównie w szczepach *E. coli* izolowanych od człowieka, a toksyna STb występuje częściej w szczepach izolowanych od zwierząt. W wyniku aktywności toksyny ST zwiększa się poziom cGMP w komórkach nabłonka jelit co finalnie prowadzi do rozwoju biegunki. Innymi markerami wirulencji są białka uczestniczące w adhezji bakterii do komórek

gospodarza, takie jak Tia (ang. enterotoxigenic invasion protein) o aktywności adhezyny i inwazyjności oraz czynnik TibA (ang. glycosylated afimbrial adhesin A) uczestniczący w adherencji drobnoustrojów i tworzeniu biofilmu (Kaper i wsp., 2004).

1.2.3 Szczepy Shigatoksyczne (STEC)

Cechą charakterystyczną szczepów o patotypie STEC jest obecność co najmniej jednego z genów *stx1* lub *stx2*, które kodują cytotoksynę zaburzającą syntezę białek w komórkach gospodarza. Istotną podgrupą szczepów STEC są enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC), chorobotwórcze głównie dla człowieka. Szczepy EHEC poza wytwarzaniem shigatoksyn powodują również zmiany histopatologiczne komórek nabłonka jelita wynikające z działania intyminy. Shigatoksyczne szczepy *E. coli* są odpowiedzialne za krwotoczne zapalenie okrężnicy, małopłytkową plamicę zakrzepową, zespół hemolityczno-mocznicowy oraz martwicze zapalenie okrężnicy. Do podstawowych czynników wirulencji szczepów STEC należą toksyny Shiga Stx1 i Stx2. Patogenne izolaty mogą zawierać pojedynczy wariant genu *stx1* lub *stx2* lub oba rodzaje. W chromosomalnej części genomu mogą występować także inne obszary kodujące czynniki zjadliwości, np. LEE odpowiedzialny za zdolność tworzenia zmian A/E. Na plazmidach mogą występować także geny kodujące fimbrie typu IV uczestniczące w kolonizacji nabłonka jelita, proteaza serynowa EspP degradująca pepsynę A, enterohemolizyna Ehly wytwarzająca pory oraz ludzki czynnik krzepnięcia V (Półtorak i wsp., 2016; Weiner M, 2011).

1.2.4 Szczepy *E. coli* powodujące infekcje pozajelitowe (ExPEC)

Szczepy ExPEC wykształciły szereg czynników wirulencji umożliwiających im przystosowanie do nowych nisz. Najczęściej są to fimbrie P i S, otoczki, siderofory, lipopolisacharyd, hemolizyna α oraz zdolność do przeżywania w surowicy. Geny warunkujące wirulentność szczepów ExPEC najczęściej zlokalizowane są na wyspach patogenności (PAI).

Najczęściej szczepy ExPEC wywołują zakażenia dróg moczowych, zapalenie pęcherza moczowego lub ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek. W tym przypadku najbardziej niebezpieczne są szczepy uropatogenne (UPEC), które dzięki obecności fimbrii P, adhezyn fimbrialnych Dr i otoczkowych Afa I i Afa III są zdolne do adhezji do powierzchni nabłonków oraz niszczenia tkanek za pomocą hemolizyny α – Hly A (Bélanger i wsp., 2011).

Szczepy ExPEC mogą być także czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w noworodków. Są tak zwane szczepy NMEC (ang. Neonatal meningitis *E. coli*), wyposażone w otoczki zbudowane z polimeru kwasu sjałowego (Bélanger i wsp., 2011; Wasiński, 2019).

Infekcje pozajelitowe u drobiu wywoływane są przez szczepy APEC (ang. Avian pathogenic *E. coli*). Najczęstsze infekcje występujące u kurcząt to zapalenie worków powietrznych, osierdzia, jajowodów i stawów. Szczepy APEC u kur wywołują również zespół obrzęku głowy, a u indyków zapalenie kości i szpiku. Kolibakterioza u drobiu jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności, spadku żywej wagi, zmniejszenia nieśności i obniżenia wskaźnika wylęgowości (Kathayat i wsp., 2021).

Szczepy ExPEC są ważnym czynnikiem etiologicznym ropomacicza u psów i kotów oraz zapalenia macicy u bydła i koni. Ropomacicze jest często spotykane u zwierząt towarzyszących i zazwyczaj charakteryzuje się szybkim przebiegiem klinicznym niekiedy prowadzącym do śmierci zwierzęcia na skutek wstrząsu (Lopes i wsp., 2020). U psów patogenne szczepy *E. coli* odpowiadają także za infekcje układu moczowego. Problemem są szczególnie infekcje nawracające, które wywoływane są przez odporne izolaty bakterii przez co ciężko jest dobrać skuteczne leczenie (Thompson i wsp., 2011).

E. coli jest główną przyczyną zapalenia wymienia u bydła. Na ciężkość zapalenia sutka mają wpływ czynniki zależne od krów, takie jak wiek i etap laktacji. Środkami przeciwdrobnoustrojowymi o udowodnionym korzystnym wpływie na leczenie są fluorochinolony i cefalosporyny, a więc leki o krytycznym znaczeniu (Suojala i wsp., 2013).

1.3 Lekooporność *Escherichia coli*

W Polsce badania dotyczące zjawiska lekooporności szczepów *Escherichia coli* dotyczą najczęściej zwierząt gospodarskich oraz towarzyszących (Rzewuska i wsp., 2015). Wiedza na temat poziomu oporności drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe, izolowanych od zwierząt wolno żyjących jest ciągle niewielka i niepełna. Jednakże nadużywanie antybiotyków w medycynie człowieka i zwierząt nieuchronnie prowadzi do pojawiania się szczepów opornych (Vittecoq i wsp., 2016; Bélanger i wsp., 2011). Niepokojący wydaje się ostatni raport ECDC (Europejskiego Centrum ds. Kontroli i Prewencji Chorób, 2020) wskazujący na znaczny wzrost izolatów *E. coli* opornych na trzecią generację cefalosporyn, fluorochinolony i aminoglikozydy. Największy wzrost zauważono w przypadku oporności na fluorochinolony.

W ciągu trzech lat zaobserwowano wzrost szczepów opornych na te chemioterapeutyki o 6,8%. Ponadto w literaturze światowej *Escherichia coli* jest najczęściej badaną i opisywaną bakterią spośród rodziny *Enterobacteriaceae* jako nosiciela oporności na chinolony (Vieira i wsp., 2020). Najnowsze badania analizujące poziom oporności szczepów *E. coli* wśród zwierząt gospodarskich w sześciu państwach europejskich również wskazują na wyższy udział izolatów opornych na fluorochinolony aniżeli w państwach z innych regionów świata na przykład Hiszpanii, Danii i Niemiec (Leekitcharoenphon i wsp., 2021). Ważnym źródłem zanieczyszczenia fluorochinolonomi środowiska naturalnego w Polsce mogą być oczyszczalnie ścieków. Badania Giebułtowicz i wsp. (2020) wykazały, iż dominującymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi w dopływie i odpływie do dwóch badanych oczyszczalni ścieków były ciprofloksacyna i sulfametoksazol. Również w próbkach osadu zanotowano najwyższe stężenie dla ciprofloksacyny (do 27 g/g) oraz norfloksacyny (do 5,3 g/g).

Zarówno trzecia i wyższe generacje cefalosporyn, jak i fluorochinolony zostały uznane jako krytycznie ważne środki przeciwdrobnoustrojowe przez Światową Organizację zdrowia (WHO, 2017). Natomiast raport EMA (European Medicines Agency, 2018) wskazuje na zwiększenie w latach 2016-2018 użycia tych grup środków przeciwdrobnoustrojowych również w medycynie weterynaryjnej.

Badania oporności szczepów *Escherichia coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących w Polsce obejmują najczęściej różne gatunki ptaków wolno żyjących. Literak i wsp. (2010) badając wymazy z kloaki kaczki krzyżówki i mewy srebrzystej wykazali obecność zarówno szczepów opornych na cefalosporyny jak i fluorochinolony. Najnowsze badanie dotyczące ptaków wolno żyjących w Polsce również wskazuje na udział szczepów *E. coli* w rozprzestrzenianiu oporności na powszechnie stosowane antybiotyki. Nowaczek i wsp. (2021) wykazali dominującą oporność na tetracyklinę, ciprofloksacynę, gentamycynę oraz ampicylinę, a szczepy *E. coli* o fenotypie wielolekoopornym stanowiły aż 31,2%. Dodatkowo wśród badanych izolatów wykazano obecność genów wirulencji klasyfikujących szczep do patotypu APEC.

Chrobak-Chmiel i wsp. (2021) wykazali obecność *E. coli* o fenotypie wielolekoopornym w próbkach pochodzących od gołębi. Natomiast w badaniach Skarżyńskiej i wsp. (2021) na szczepach pozyskanych od dzikich ptaków połowa szczepów była oporna na co najmniej jeden badany środek przeciwdrobnoustrojowy, przy czym aż 38.6% szczepów wykazywało

jednocześnie fenotyp wielolekooporny. Dominującym profilem oporności była oporność na ampicylinę i tetracyklinę. Wysoki był też udział szczepów opornych na chinolony oraz sulfametoksazol, natomiast oporność na gentamycynę była znikoma.

W literaturze dotyczącej badań prowadzonych na zwierzętach wolno żyjących, pochodzących z terenu Polski, występują również pojedyncze doniesienia prezentujące występowanie szczepów *E. coli* wśród gryzoni i zwierząt kopytnych. Skarżyńska i wsp. (2020) przebadali sumarycznie 237 próbek uzyskanych od pięciu gatunków gryzoni: myszy zaroślowej, myszy polnej przęgowanej, nornicy zwyczajnej, nornicy rudej i myszy domowej. Spośród 263 uzyskanych izolatów *E. coli* tylko pięć wykazywało oporność na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe.

U zwierząt kopytnych szeroką analizę pod względem profili oporności i obecności genów oporności przeprowadzili Wasyl i wsp. (2018). Spośród próbek pochodzących między innymi od jeleni, saren, danieli i dzików izolaty *E. coli* wykazywały oporność na streptomycynę, tetracyklinę i sulfametoksazol. Wykazał obecność izolatów opornych na cefalosporyny (1,7%) o dominujących genach oporności *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-15}* i *bla_{CMY-2}*. Dodatkowo autorzy udowodnili obecność genów PMQR, głównie genu *qnrS* odpowiedzialnych za oporność na fluorochinolony, przekazywaną na drodze wymiany horyzontalnej.

Powyższe badania wskazują na występowanie lekoopornych i/lub wirulentnych szczepów *E. coli* również w środowisku dzikich zwierząt. Badań tych jest jednak wciąż mało. Wydaje się, iż wynika to przede wszystkim z małej dostępności do materiału badawczego. Większość gatunków zwierząt wolno żyjących jest objęta ochroną prawną, a ich celowe odławianie czy immobilizacja wyłącznie celem pobrania materiału badawczego nie jest dozwolone i wymaga odpowiednich zezwoleń wyznaczonych organów. Pozyskiwanie materiału odbywa się zatem najczęściej albo w przypadku wykonywania innych, koniecznych działań po uzyskaniu stosownej zgody na nieinwazyjne pobranie materiału (np. przy przeprowadzaniu badań telemetrycznych) (Nowakiewicz i wsp., 2015), albo próbki pobierane są od martwych zwierząt, które zostały zabite w wyniku np. odstrzału sanitarnego lub zostały dostarczone do jednostek badawczych celem przeprowadzenia badania diagnostycznego w kierunku wykrycia innych chorób (np. diagnostyki wirusa wścieklizny) (Nowakiewicz i wsp., 2016). Inną alternatywą może być kolekcjonowanie prób zbiorczych ze środowiska, niemniej w takiej sytuacji trudno oszacować od jakiej liczby osobników pochodzi próbka (np. próbka kału) i jakim warunkom

środowiskowym była poddawana, co niesie ze sobą ryzyko przeszacowania lub niedoszacowania wyników.

W związku z rosnącą ilością szczepów opornych na krytyczne środki przeciwdrobnoustrojowe (ECDC 2020) uznałam za zasadne przeprowadzenie analizy lekooporności szczepów *E. coli*, jako jednego z gatunków wskaźnikowych, izolowanych od zwierząt wolno żyjących pochodzących z typowo rolniczego terenu Polski jakim jest Wyżyna Lubelska i okolice. Badania obejmowały wielopoziomową analizę występowania lekooporności u badanych szczepów, jak również wykorzystanie nowoczesnych technik różnicowania tych izolatów. Dodatkowo grupy badawcze zostały podzielone pod względem typu diety zwierząt, natomiast jedna grupa badawcza obejmuje szczepy odporne na III generację cefalosporyn pochodzące głównie od lisa rudego, gatunku o znacznym stopniu synantropizacji.

2. Uzasadnienie i cele pracy

Dane dotyczące analizy zjawiska oporności szczepów *E. coli* na substancje przeciwbakteryjne w Polsce dotyczą przede wszystkim zwierząt gospodarskich i towarzyszących. Dotychczasowe badania poziomu oporności szczepów *E. coli* pochodzących od zwierząt wolno żyjących są w Polsce fragmentaryczne. Zwierzęta wolno żyjące jako nie poddawane terapii celowanej powinny cechować się nosicielstwem znacznie niższego odsetka szczepów wielolekoopornych w porównaniu do zwierząt hodowlanych i towarzyszących. Z tego powodu analiza tej grupy zwierząt jako potencjalnego rezerwuaru szczepów *E. coli* daje realne odwzorowanie skali oporności występującego w środowisku. Niedoścignienie badań wynika przede wszystkim z trudności w dostępie do materiału badawczego. Większość gatunków zwierząt wolno żyjących w Polsce jest pod ochroną prawną. Materiał do badań pozyskiwany jest również przy okazji wykonywania innych badań lub podczas odstrzałów zwierząt.

Na podstawie wyników dotychczasowych badań, przyjęto hipotezę, iż zwierzęta wolno żyjące występujące w Polsce mogą być nosicielami szczepów *E. coli* wykazujących oporność na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe.

Dwie pierwsze grupy badanych zwierząt zostały podzielone pod względem stosowanej diety. W literaturze światowej występują doniesienia, że zwierzęta mięsożerne mogą mieć zdolność swego rodzaju akumulacji opornych szczepów *E. coli* jako zwierzęta stanowiące ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego. Z tego powodu mogą być nosicielami większego odsetka izolatów wielolekoopornych aniżeli zwierzęta wszystkożerne i roślinożerne. Trzecią grupą badawczą są izolaty *E. coli* odporne na cefalosporyny, zatem bardzo istotne z punktu widzenia zagrożenia zdrowia publicznego. Większość szczepów należących do ostatniej grupy badawczej pochodziła od lis rudego, a gatunek ten coraz częściej staje się nieodłącznym elementem zurbanizowanego krajobrazu w naszym kraju. Jest to gatunek szeroko rozpowszechniony w Polsce i ma wysoki potencjał synantropizacji związany z postępującą fragmentacją terenów stanowiących naturalne siedliska i dążnością do wykorzystywania źródeł łatwo dostępnego pokarmu przez ten gatunek zwierząt. Coraz bliższy kontakt zwierząt wolno żyjących ze środowiskiem życia człowieka nieuchronnie włącza tę grupę w cykl krążenia i rozprzestrzeniania się lekooporności, a jednocześnie zwiększa ryzyko dwukierunkowego przenoszenia bakterii opornych na leki i nasilenie kontaminacji środowiska.

Badania miały na celu:

1. Określenie poziomu występowania w aspekcie porównawczym lekoopornych szczepów *E. coli* u różnych gatunków zwierząt wolno żyjących.
2. Charakterystyka fenotypowych profili oporności i określenie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko wśród badanych izolatów, ze szczególnym uwzględnieniem typów oporności stanowiących potencjalne zagrożenie zdrowia publicznego.
3. Określenie występowania genetycznych markerów wirulencji determinujących przypuszczalny potencjał zoonotyczny z jednoczesną analizą korelacji pomiędzy opornością a wirulencją.
4. Charakterystyka i ocena podobieństwa genomowego szczepów w aspekcie zróżnicowania szczepów występujących u tego samego osobnika oraz potencjalnych możliwości rozprzestrzeniania się tych samych klonów pomiędzy różnymi osobnikami tego samego gatunku, a nawet wśród różnych gatunków.
5. Analiza epidemiologiczna w odniesieniu do ogólnoswiatowych baz danych, szczepów stanowiących największe zagrożenie zdrowia publicznego, tj. opornych na cefalosporyny III generacji i fluorochinolony.

3. Materiał i metody

3.1 Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiły wymazy pobrane z prostnicy różnych gatunków zwierząt. Materiał został pobrany przez wykwalifikowanych pracowników Zakładu Higieny Weterynaryjnej (ZHW) w Lublinie, zamrożony i przechowywany w temperaturze -80°C do momentu rozpoczęcia procedury izolacji. Materiał został podzielony na trzy grupy badawcze. W pierwszej grupie były to 53 wymazy pobrane od mięsożernych zwierząt wolno żyjących: borsuk *Meles meles* (n = 13), jenot *Nyctereutes procyonoides* (n = 10), norka amerykańska *Neovison vison* (n = 10), kuna domowa *Martes foina* (n = 18) i tchórz europejski *Mustela putorius* (n = 2), w drugiej grupie przebadano 108 wymazów pobranych od roślinożernych i wszystkożernych zwierząt wolno żyjących: wiewiórka pospolita *Sciurus vulgaris* (n = 30), szczur *Rattus* (n = 16), jeż europejski *Erinaceus europaeus* (n = 8), sarna europejska *Capreolus capreolus* (n = 6), jelen szlachetny *Cervus elaphus* (n = 34), zając europejski *Lepus europaeus* (n = 7), nornik *Apodemus agrarius* (n = 2), chomik europejski *Cricetus cricetus* (n = 3) oraz bóbr europejski *Castor fiber* (n = 2). Trzecia grupa badawcza obejmowała 42 izolaty *E. coli* odporne na cefotaksym, pochodzące od zwierząt wolno żyjących, zgromadzone w latach 2015-2019, w trakcie badań lekooporności różnych gatunków drobnoustrojów występujących głównie u: lisa rudego (*Vulpes vulpes*, n=352), kuny domowej *Martes foina*, n=40- osobniki należące do drugiego gatunku nie były analizowane w publikacji Osińska i wsp. 2020, różnych gatunków ptaków wolno żyjących (kaczki krzyżówki *Anas platyrhynchos* n = 3, łabędzia niemeo *Cygnus olor*, n = 2), czapli siwej *Ardea cinerea*, n = 3, jastrzębia zwyczajnego *Accipiter gentilis*, n = 2, gołębia grzywacza *Columba palumbus*, n = 2, gęsi gęgawy *Anser*, n = 2, bażanta *Phasianus colchicus*, n = 2, wrony szarej *Corvus tristis*, n = 3) i uszatki *Asio otus*, n = 3 oraz środowiskowych przedstawicieli zwierząt bezkręgowych (ślimak winniczek, *Helix pomatia*).

3.2 Podstawa prawna prowadzonych badań:

Materiał do badań (martwe zwierzęta) został dostarczony do Zakładu Higieny Weterynaryjnej. Zwierzęta nie zostały uśmiercone wyłącznie ze względu na pobieranie próbek do badań prowadzonych w niniejszych pracach. Ponieważ przypadki wścieklizny u zwierząt są nadal wykrywane w Polsce, w przypadku podejrzenia objawów wścieklizny zwierzęta wolno żyjące, w tym lisy i kuny, zostają poddane obserwacji diagnostycznej przez wykwalifikowany personel weterynaryjny, a w przypadku zgonu w trakcie obserwacji, zwierzęta te są dostarczane do

urzędowego laboratorium. Dodatkowo w przypadku lisów obowiązuje ocena skuteczności szczepienia przeciwko wściekliznie, w związku z czym co roku myśliwi muszą odstrzelić określoną liczbę zwierząt i dostarczyć do urzędowego laboratorium w celu przeprowadzenia odpowiednich badań (Polish Veterinary Inspection, 2019). Ponieważ materiał pobrano od martwych zwierząt przebadanych w ZHW na podstawie ustawy o ochronie zdrowia zwierząt i zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz.U. 2004 nr 69 poz. 625 z późn. zm.), do badań nie była wymagana zgoda właściwego organu Komisji Etycznej.

Wszystkie wymazy pochodziły od zwierząt z negatywnym wynikiem testu na obecność wścieklizny i do czasu uzyskania wyniku były przechowywane w temperaturze -80°C .

3.3 Metodyka

3.3.1 Izolacja szczepów *E. coli*

Wymazy w pierwszym etapie zostały poddane wstępnej inkubacji w wodzie peptonowej (Biomaxima, Lublin, Polska) w temperaturze 37°C przez 24 h, celem niewybiórczego namnożenia mikroorganizmów. Następnie, 100 µl zawiesiny przeniesiono sterylnie na cztery rodzaje płytek Petriego ze stałym podłożem MacConkey Agar (Biomaxima, Lublin, Polska) suplementowanych środkami przeciwdrobnoustrojowymi: tetracyklina (8 mg/L), cefotaksym (2 mg/L), chloramfenikol (16 mg/L) oraz kanamycyna (32 mg/L) (Sigma- Aldrich, Hamburg, Niemcy). Doboru stężeń substancji przeciwdrobnoustrojowych dokonano na podstawie kryteriów CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute). Wybrane wartości antybiotyków klasyfikowały szczepy jako co najmniej średniowrażliwe. Płytki z inokulowaną zawiesiną inkubowano w temp 35 ± 2°C przez 24 godziny. Do dalszych analiz wybierano typowe dla *E. coli*, laktozo-pozytywne kolonie. Wybrane kolonie oczyszczono i zidentyfikowano za pomocą metod biochemicznych: próby na indol (reakcja z odczynnikiem Ehrlicha Kovacsa, Sigma- Aldrich, Hamburg, Niemcy), reakcja na podłożu z cytrynianem (podłoże wg Simmonsa, Argenta, Poznań, Polska) i zdolność do rozkładu laktozy, glukozy i wytwarzania siarkowodoru na podłożu Kliglera (Biomaxima, Lublin, Polska). Do dalszych analiz wybierano kolonie indolo-pozytywne, nie wykorzystujące cytrynianu do wzrostu na podłożu Simmonsa oraz fermentujące glukozę i laktozę z wytworzeniem gazu, bez produkcji siarkowodoru na podłożu Kliglera.

3.3.2 Wstępne określenie fenotypowych profili oporności – metoda dyfuzyjno krążkowa (ang. DDM, disc diffusion method)

W publikacji 1 i 2 w celu eliminacji tych samych izolatów pochodzących z tej samej próbki (wymazu), przeprowadzono wstępną ocenę fenotypowych profili oporności metodą dyfuzyjno-krążkową. Badaniu porównawczemu poddano tylko izolaty uzyskane z tej samej próbki, które wyrosły na co najmniej dwóch płytkach z podłożem MacConkeya suplementowanych różnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. W obydwu publikacjach wykorzystano panel sześciu środków przeciwdrobnoustrojowych: kanamycynę (30µg), gentamycynę (10 µg), enrofloksacynę (5 µg), tetracyklinę (30 µg), florfenikol (30 µg) i kolistynę (10 µg) (Argenta, Poznań, Polska). Stężenie użytych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z kryteriami Clinical laboratory Standard Institute (CLSI,

2015). Szczepy *E. coli* różniące się wrażliwością na co najmniej dwa lub więcej substancji przeciwbakteryjnych zostały wstępnie zaklasyfikowane jako różne.

Izolaty pochodzące z podłoża suplementowanego cefotaksymem (potencjalny ESBL lub AmpC) zostały dodatkowo ocenione za pomocą testu podwójnej dyfuzji z użyciem następujących krążków antybiotykowych: cefotaksym (30 µg), cefotaksym/kwas klawulanowy (30/10 µg), ceftazydym (30 µg) i ceftazydym/kwas klawulanowy (30/10 µg) (Sigma- Aldrich, Hamburg, Niemcy). Jako materiał odniesienia użyto szczep *E. coli* ATCC25922 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

3.3.3 Określenie fenotypowych profili oporności za pomocą metody mikrorozcieńczeń

Fenotypowy profil oporności szczepów w oparciu o minimalne stężenie hamujące (MIC) oznaczono metodą mikrorozcieńczeń. Wykorzystano panel 11 następujących substancji przeciwdrobnoustrojowych: cefotaksym (1-64 µg/ml), kanamycyna (2-128 µg/ml), streptomycyna (2-128 µg/ml), gentamycyna (0,25-16 µg/ml), ampicylina (4-256 µg/ml), chloramfenikol (0,5-32 µg/ml), sulfametoksazol (1-1024 µg/ml), tetracyklina (0,5-32 µg/ml), ciprofloksacyna (0,03-32 µg/ml), kwas nalidyksowy (1-64 µg/ml) i nitrofurantoina (2-128 µg/ml). Kryteria interpretacji wyników przeprowadzono zgodnie ze standardami CLSI (2015 w publikacji nr 1 i 2 oraz 2018 w publikacji nr 3). Jako kontrolę pozytywną w publikacji 1 i 2 użyto szczep *E. coli* ATCC25922, natomiast dla publikacji nr3 również *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Izolaty zostały zaklasyfikowane jako wielolekooporne jeśli wykazywały oporność na przynajmniej jeden antybiotyk z co najmniej 3 różnych klas środków przeciwdrobnoustrojowych, zgodnie z kryteriami opublikowanymi przez (Magiorakos i wsp., 2012).

3.3.4 Analiza występowania genów oporności

Całkowite genomowe DNA badanych szczepów we wszystkich publikacjach zostało uzyskane w oparciu o wykorzystanie zestawu kolumnowego do oczyszczania DNA Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (Eurx, Gdańsk, Polska)

Obecność wybranych genów oporności została określona za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR). Przeanalizowano panel genów kodujących oporność na następujące środki przeciwdrobnoustrojowe: streptomycynę (*strA*), kanamycynę

[*aph(3')-Ia* i *aph(3')-IIa*], gentamycynę [*aac(3)-II* i *aac(3)-III*], fenikole [*cmlA*, *cat*, *floR*], tetracyklinę [*tetA* i *tetB*] oraz sulfonamidy [*sul1*, *sul2*, *sul3*].

W publikacji numer 3 dodatkowo sprawdzono obecność genów *strB* i *aad* kodujących oporność na streptomycynę. Wybór tych dodatkowych genów został podyktowany wysokim udziałem szczepów opornych na ten środek przeciwdrobnoustrojowy zaobserwowany w dwóch poprzednich publikacjach. Szczepy o fenotypie opornym na cefotaksym zostały przebadane na obecność genów kodujących wytwarzanie beta-laktamaz: *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{CTM-M-9}*, *bla_{CTX-M-25}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CIT}*, *bla_{MOX}*, *bla_{DHA}*, *bla_{ACCF}*, *bla_{EBC}* i *bla_{FOX}*. Dodatkowo sprawdzono obecność następujących genów PMQR: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qep* i *aac(6')-Ib*.

Tabela 1. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcjach PCR oraz warunki reakcji PCR

Badany gen	Sekwencje starterów (5' do 3')	Temp. annealingu (°C)	Wielkość ampliconu (pz)	Literatura
Geny oporności				
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	210	Literak i wsp., 2010
<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCCAATAACACCG	55	659	Literak i wsp., 2010
<i>cat</i>	F: CCTGCCACTCATCGCAGT R: CCACCGTTGATATATCCC	55	623	Literak i wsp., 2010
<i>cmlA</i>	F: TGTCATTTACGGCATACTCG R: ATCAGGCATCCCATTCCCAT	55	455	Literak i wsp., 2010
<i>floR</i>	F: GCGATATTCATTACTTTGGC R: TAGGATGAAGGTGAGGAATG	50	425	Literak i wsp., 2010
<i>sul1</i>	F: CTTCGATGAGAGCCGGCGGC R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	68	417	Literak i wsp., 2010
<i>sul2</i>	F: AGGGGGCAGATGTGATCGAC R: GCAGATGATTTCCGCAATTG	58	249	Literak i wsp., 2010
<i>sul3</i>	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	55	789	Literak i wsp., 2010
<i>strA</i>	F: CCTATCGGTTGATCAATGTC R: GAAGAGTTTTAGGGTCCACC	58	250	Literak i wsp., 2010
<i>strB</i>	F: GGATCGTAGAACATATTGGC R: ATCGTCAAGGGATTGAAACC	56	509	Hendriksen i wsp., 2008
<i>aad</i>	F: ATTTGCTGGTTACGGTGACC R: CTCAAGTCTGACGGGCTGA	56	534	Hendriksen i wsp., 2008
<i>aph(3')-Ia</i>	F: ATGGGCTCGCGATAATGTC R: CTCACCGAGGCAGTTCCAT	50	600	Sáenz i wsp., 2004
<i>aph(3')-IIa</i>	F: GAACAAGATGGATTGCACGC R: GCTCTTCAGCAATATCACGG	50	680	Sáenz i wsp., 2004

<i>aac(3)-II</i>	F: TGAAACGCTGACGGAGCCTC R: GTCGAACAGGTAGCACTGAG	58	369	Jakobsen i wsp., 2008
<i>aac(3)-III</i>	F: GTGCATCGCAGCGCAAACCCC R: CAAGCCACTGCACCGCAAACCG	64	436	Jakobsen i wsp., 2008
<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	52	516	Kim i wsp., 2009
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ATGAGCAACGATGCCTGGTA	51	476	Kim i wsp., 2009
<i>qnrC</i>	F: GGGTTGTACATTTATTGAATCG R: CACCTACCCATTTATTTTCA	52	307	Kim i wsp., 2009
<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	52	428	Kim i wsp., 2009
<i>aac(6')-Ib</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	55	482	Kim i wsp., 2009
<i>qep</i>	F: AACTGCTTGAGCCCGTAGAT R: GTCTACGCCATGGACCTCAC	53	596	Kim i wsp., 2009
<i>bla_{SHV}</i>	F: CTTTATCGGCCCTCACTCAA R: AGGTGCTCATCATGGGAAAG	62	237	Fang i wsp., 2008
<i>bla_{TEM}</i>	F: CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	60	445	Fang i wsp., 2008
<i>bla_{oxa}</i>	F: ACACAATACATATCAACTTCGC R: AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	62	813	Fang i wsp., 2008
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	F: AAAAATCACTGCGCCAGTTC R: AGCTTATTCATCGCCACGTT	52	415	Woodford i wsp., 2006
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	F: CGACGCTACCCCTGCTATT R: CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG	52	552	Woodford i wsp., 2006
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	F: TCGCGTTAAGCGGATGATGC R: AACCCACGATGTGGGTAGC	52	666	Woodford i wsp., 2006
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	F: CAAAGAGAGTGCAACGGATG R: ATTGGAAAGCGTTCATCACC	52	205	Woodford i wsp., 2006
<i>bla_{CTX-M-25}</i>	F: GCACGATGACATTCGGG R: AACCCACGATGTGGGTAGC	52	327	Woodford i wsp., 2006
<i>bla_{AAC}</i>	F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	60	346	Pérez- Pérez, Hanson, 2002
<i>bla_{FOX}</i>	F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	60	190	Pérez- Pérez, Hanson, 2002
<i>bla_{MOX}</i>	F: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT R: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	60	520	Pérez- Pérez, Hanson, 2002
<i>bla_{DHA}</i>	F: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	60	405	Pérez- Pérez, Hanson, 2002
<i>bla_{CTI}</i>	F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	60	462	Pérez- Pérez,

				Hanson, 2002
<i>bla_{EBC}</i>	F: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG R: CTCCACTGCGGCTGCCAGTT	60	302	Pérez- Pérez, Hanson, 2002
Geny wirulencji				
<i>afa/draBC</i>	F: TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG R: CCAGTAACTGTCCGTGACA	63	810	Nowak i wsp., 2017
<i>sfa/foc</i>	F: CGGAGAACTGGGTGCATCTTA R: GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA	63	1242	Nowak i wsp., 2017
<i>kpsMTII</i>	F: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA R: GCGCATTGCTGATACTGTTG	63	270	Nowak i wsp., 2017
<i>escV</i>	F: ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG R: CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC	58	544	Nowak i wsp., 2017
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63	300	Nowak i wsp., 2017
<i>papAH</i>	F: ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG R: CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	63	721	Nowak i wsp., 2017
<i>ea/ I</i>	F: ATGCAATGGCAGTACCCTTC R: ATAAACACAATATGGCGCTCG	51	761	Nowak i wsp., 2017
<i>eltA</i>	F: GGCGACAGATTATACCGTGC R: CCGAATTCTGTTATATATGTC	51	696	Chapman i wsp., 2006
<i>estII</i>	F: ATCGCATTTCTTCTTGATC R: GGGCGCCAAAGCATGCTCC	53	172	Chapman i wsp., 2006
<i>estI</i>	F: TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG R: ACAGGCAGGATTACAACAAAG	53	166	Chapman i wsp., 2006
<i>bfp</i>	F: ACAAAGATACAACAAACAAAA R: TTCAGCAGGAGTAAAAGCAGTC	55	260	Ruiz i wsp. 2002
<i>hlyA</i>	F: AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	63	1177	Ruiz i wsp. 2002
<i>papC</i>	F: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	63	328	Ruiz i wsp. 2002
<i>stx1</i>	F: CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC R: CGTGGTATAGCTACTGTCACC	55	302	Blanco i wsp., 2003
<i>stx2</i>	F: CTTCGGTATCCTATTCCCGG R: CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	55	516	Blanco i wsp., 2003

3.3.5 Analiza genów wirulencji

W badaniu wykorzystano całkowite genomowe DNA uzyskane w sposób jak opisano w punkcie 3.3.4. W publikacjach 2 i 3 za pomocą metody PCR sprawdzono obecność wytypowanych genów wirulencji, na podstawie których izolaty przypisano do patotypu ExPEC, ETEC, EPEC lub EHEC. Szczepy były klasyfikowane do patotypu ETEC na podstawie obecności co najmniej jednego z genów: *STa*, *STb*, *eltA*. Patotyp EPEC oznaczano na podstawie obecności genów: *ea-I*, *escV* lub *bfp*. Patotyp EHEC charakteryzował się obecnością genów odpowiedzialnych za produkcję toksyn: geny *stx1* i *stx2*. Szczepy należące do patotypu ExPEC wykazywały obecność co najmniej dwóch genów spośród badanych: *papC*, *papAH*, *sfa/foc*, *kpsMTII*, *iutA*, *afa/draBC*, *hlyA*.

3.3.6 Typowanie molekularne w oparciu o całkowite genomowe DNA z wykorzystaniem metody ADSRRS fingerprinting – Amplifikacja fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne

W publikacji 1 i 2 wykorzystano metodę ADSRRS do oceny podobieństwa genomowego uzyskanych szczepów *E. coli*. W oparciu o tę technikę analizowany jest cały genom bakteryjny bez konieczności znajomości jego sekwencji nukleotydowej. Wykorzystując zjawisko supresji możliwa jest amplifikacja ograniczonej liczby fragmentów DNA flankowanych adaptorami o sekwencji homologicznej do końców fragmentów uzyskanych w wyniku trawienia enzymem rzadko i często tnącym. W pierwszym etapie całkowite DNA bakterii (uzyskane zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.3.4. zostało poddane trawieniu dwóch enzymów restrykcyjnych *XbaI* i *BglIII* (Nzytech, Lizbona, Portugalia) w temperaturze 37° C przez 60 minut. W kolejnym etapie otrzymane fragmenty restrykcyjne poddano reakcji ligacji z adaptorami homologicznymi do lepkich końców fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia, z wykorzystaniem ligazy faga T4 (2U/μl) ((Nzytech, Lizbona, Portugalia) przez 60 minut w temperaturze 25° C. Po zakończonej ligacji przeprowadzono inaktywację termiczną w 70° C przez 5 minut. Następnie przeprowadzono reakcję amplifikacji. Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 25μl składała się z 5 μl Gold taq MIX (Syngen Biotech, Wrocław, Polska), 2 μl mieszaniny ligacyjnej po inaktywacji, oraz 50 pmol każdego ze starterów (Genomed, Warszawa, Polska).

Tabela 2. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji ADSRRS-fingerprinting.

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa (5' do 3')
ADSRRS1	CCTTCATCCACCAACGTCGAC
ADSRRS2	GGATGGTAGACGAAGGAACGC

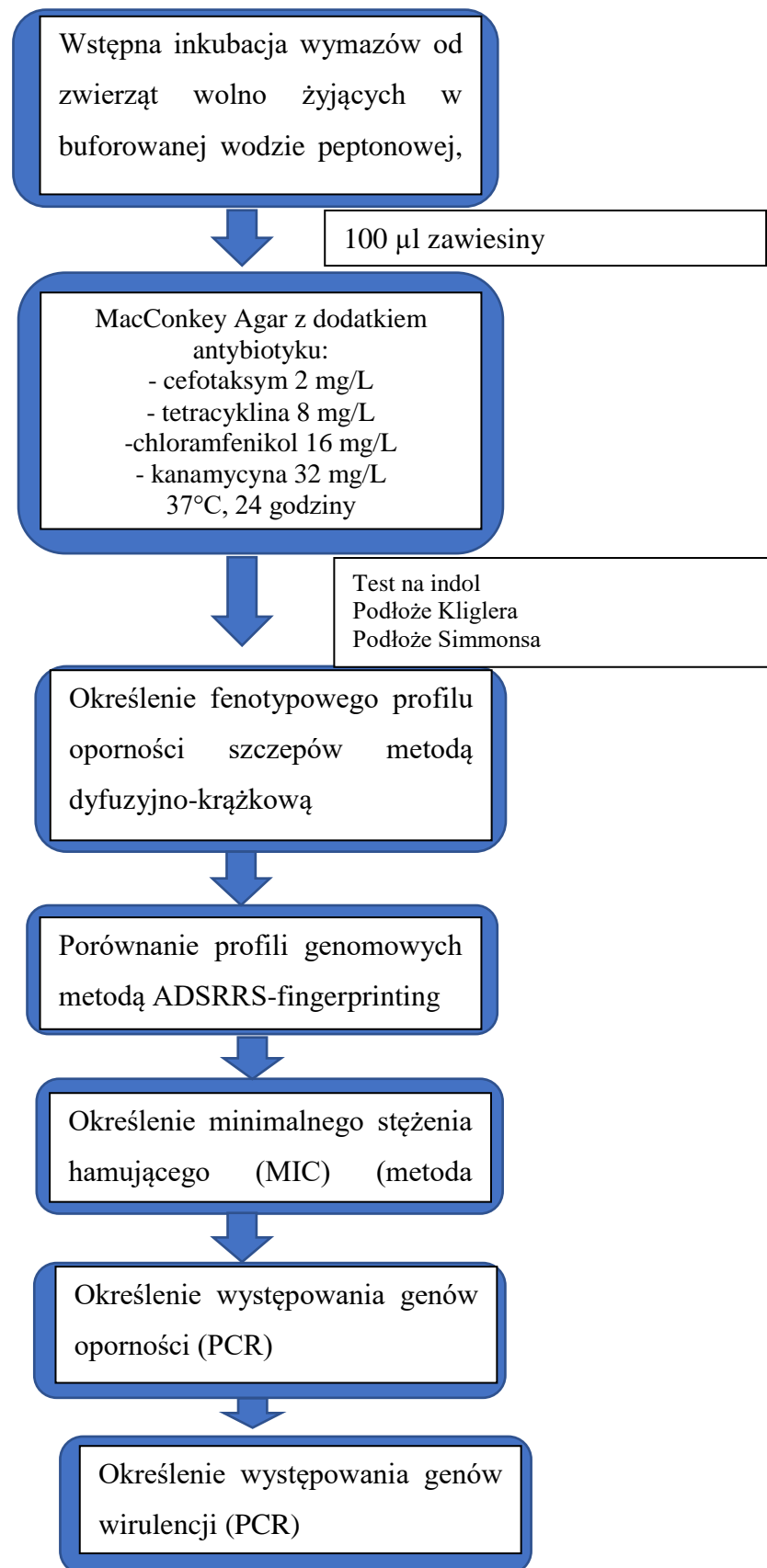
Tabela 3. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR ADSRRS-fingerprinting

Etap	Temperatura (°C)	Czas (s)	Ilość cykli
Denaturacja wstępna – oddysocjowanie oligonukleotydów pomocniczych	94	300	Pre PCR
Wypełnianie końców	72	300	
Denaturacja wstępna	94	300	
Denaturacja	94	30	22 cykle
Dołączanie starterów	60	30	
Wydłużanie	72	90	
Wydłużanie końcowe	72	300	-
Chłodzenie	4		-

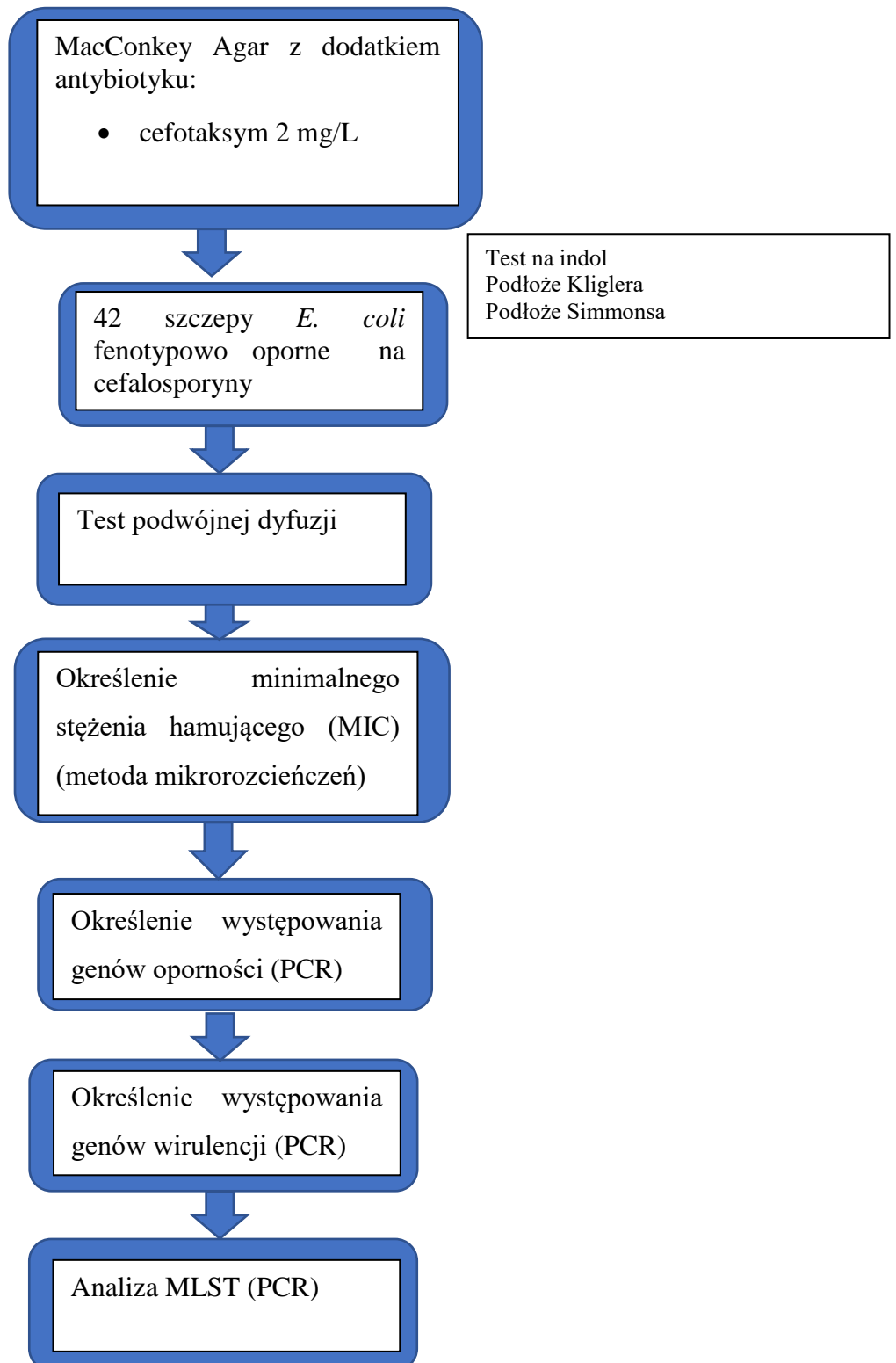
3.3.7 Typowanie molekularne w oparciu o metodę wielolokusowej analizy sekwencji genów (ang. multilocus sequence typing, MLST)

W publikacji nr 3 przeprowadzono ocenę podobieństwa szczepów za pomocą metody MLST. Przeprowadzono amplifikację siedmiu genów metabolizmu podstawowego (*adk*, *recA*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *gyrB*) według protokołu dostępnego na stronie <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>. Otrzymane produkty po amplifikacji zostały oczyszczone przy użyciu zestawu Clean-up (A & A Biotechnology, Gdańsk Polska) i przesłane do sekwencjonowania przez firmę zewnętrzną Genomed S.A, Warszawa, Polska. Produkty sekwencjonowania porównano z sekwencjami referencyjnymi szczepu *E. coli* MG1655 używając programu MEGA wersja 6.0. Numery alleli dla każdego genu otrzymano poprzez porównanie z dostępnymi allelami zgromadzonymi w bazie *E. coli* MLST (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search). Typy sekwencyjne (ST) wyznaczono poprzez dopasowanie otrzymanych siedmiu profili allelicznych.

Schemat metodyki badawczej w przypadku materiału badawczego analizowanego w publikacjach nr 1 i 2



Schemat metodyki badawczej szczepów *E. coli* opornych na cefalosporyny III generacji, analizowanych w pracy nr 3



4. Wyniki

4.1 Izolacja i identyfikacja szczepów

Sumarycznie przebadalam 161 wymazów pobranych od zwierząt wolno żyjących (publikacja 1 i 2). Na podłożu MacConkeya suplementowanym środkiem przeciwdrobnoustrojowym pozytywny wzrost uzyskałam łącznie w przypadku 57,8% próbek. Jednakże u zwierząt mięsożernych uzysk izolatów był większy (71.6%) aniżeli u zwierząt wszystkożernych i roślinożernych (50,9%). Spośród 93 próbek wykazujących pozytywny wzrost na podłożu użytym do izolacji, z 52 uzyskano wzrost na podłożu MacConkeya z dodatkiem jednego antybiotyku. Z 28 próbek otrzymano typowe dla *E.coli* izolaty wyrosłe na dwóch płytkach z dodatkiem różnych antybiotyków. Szczepy wyrosłe na trzech płytkach z podłożem MacConkeya z antybiotykiem stanowiły 10.8%, a te wykazujące pozytywny wzrost na czterech płytkach 3,2%. W przypadku zwierząt mięsożernych (publikacja 1) z większości próbek uzyskano wzrost na co najmniej dwóch płytkach suplementowanych antybiotykiem. Wśród zwierząt wszystkożernych i roślinożernych większość próbek charakteryzował wzrost na podłożu z jednym lekiem.

Po przeprowadzeniu analiz biochemicznych, jako *E. coli* potwierdzono 150 szczepów. Izolaty, które wyrosły na płytkach z podłożem suplementowanym co najmniej dwoma antybiotykami, przebadano pod kątem podobieństwa fenotypowych profili oporności szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową, celem wstępnej eliminacji szczepów powtarzających się. Na tym etapie metoda dyfuzyjno-krażkowa pozwoliła wyeliminować jedynie 13 szczepów.

4.2 Różnicowanie z wykorzystaniem techniki ADSRRS-fingerprinting

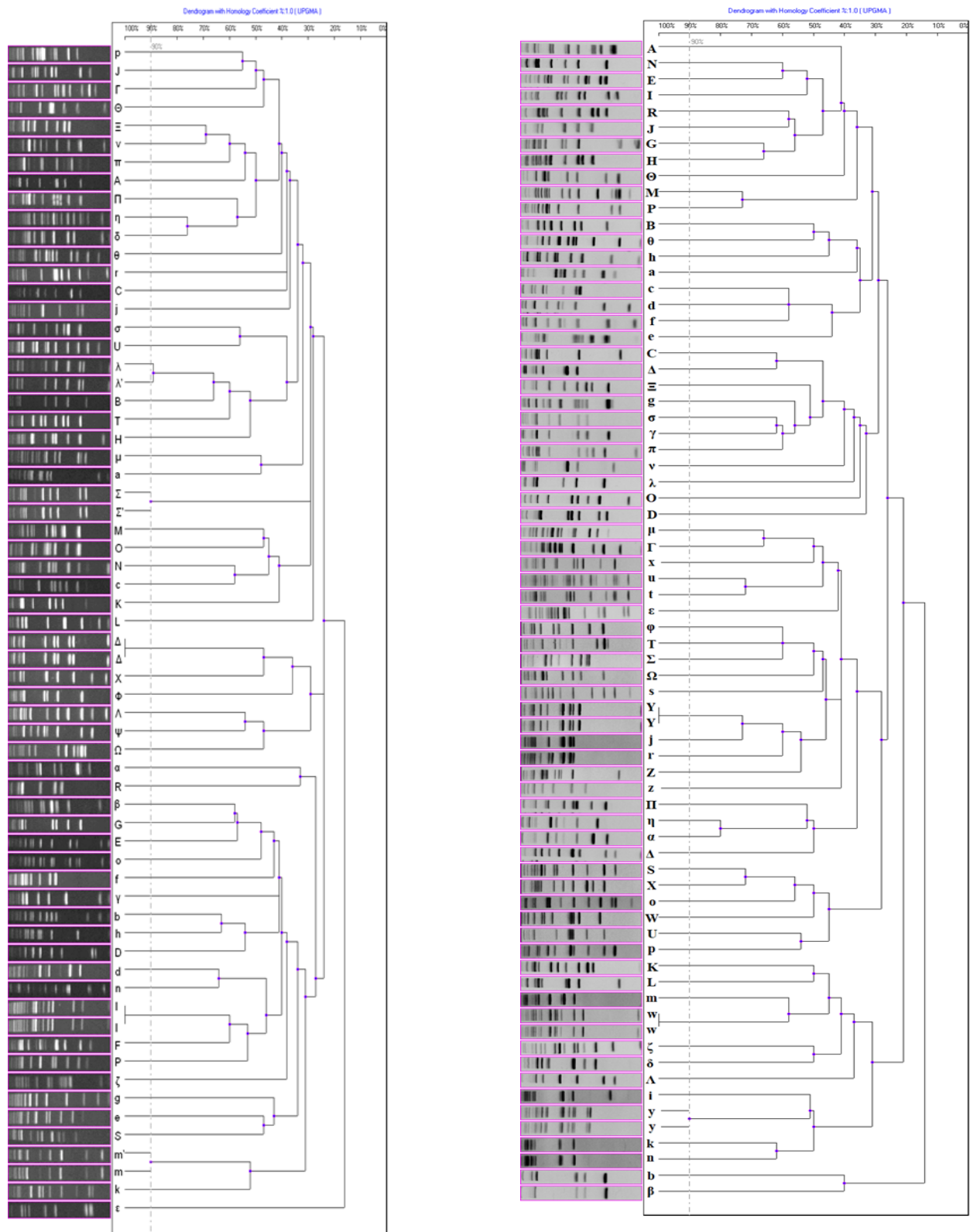
W drugim etapie różnicowania wszystkie izolaty przeanalizowano z wykorzystaniem metody ADSRRS fingerprinting, w celu porównania ich profili genomowych. Przebadane szczepy charakteryzowały się dużą różnorodnością profili genomowych, a poszczególne profile różniły się zarówno liczbą prążków (od 5 do 19) jak i wielkością amplifikowanych fragmentów. Szczepy określone jako różne wykazywały stopień podobieństwa poniżej 90%. W pracy nr 1 metoda ADSRRS pozwoliła na wyodrębnienie 14 różnych profili genomowych wśród izolatów pochodzących od borsuków. W tej grupie próbek znalazły się także dwa szczepy pochodzące z tej samej próbki (B2/TET i B2/CHL) i wykazujące podobieństwo powyżej 90%, mimo, iż zastosowana wcześniej metoda dyfuzyjno-krażkowa pozwoliła na określenie tych szczepów jako różne. Wyosobniono również 13 różnych profili genomowych od jenotów, 11 uzyskanych

od nerek, 19 od kun i dwa odrębne profile szczepów uzyskanych od tchórzy. Zanotowano również podobieństwo na poziomie 100% w przypadku dwóch szczepów wyizolowanych od dwóch różnych zwierząt (norki -N20/TET i N13/TET). Ponadto wysokie podobieństwo na poziomie 90-91 % występowało pomiędzy trzema parami szczepów: B100/KAN i B100/TET, J85/KAN i J86/TET oraz N13/KAN i N13/CHL.

W grupie zwierząt wszystkożernych i roślinożernych metoda ADSRRS również pozwoliła na wykazanie znacznego zróżnicowania genomowe wyizolowanych szczepów *E. coli*. Otrzymano 24 różne profile genomowe szczepów z próbek pochodzących od wiewiórek, 14 spośród szczurów, 15 z jeleni, po 8 profili z próbek izolowanych od saren i jeży oraz jeden profil szczepu uzyskanego od bobra. 100% podobieństwa wykazywały izolaty S145/CHL i S145/CEF uzyskane z tej samej próbki od wiewiórki i oraz dwie pary izolatów uzyskane z różnych próbek ale od tego samego gatunku zwierząt (jeleń szlachetny: J163/TET i J169/TET oraz J175/CHL i J178/CHL).

W publikacji nr 3 ogółem przebadano 42 izolaty *E.coli* i potwierdzono ich oporność na III generację cefalosporyn. Większość badanych izolatów pochodziła od lisa rudego (n=37), trzy szczepy wyizolowano od kuny domowej, a tylko po jednym szczepie od ślimaka winniczka i kaczki krzyżówki. W metodyce tej pracy nie stosowano do różnicowania techniki ADSRRS fingerprinting ze względu na fakt, iż izolowano tylko pojedyncze szczepy od poszczególnych zwierząt.

Rycina 1. Podobieństwo profili genomowych szczepów *E. coli* w publikacji 1 (po lewo) i w publikacji 2 (po prawo).

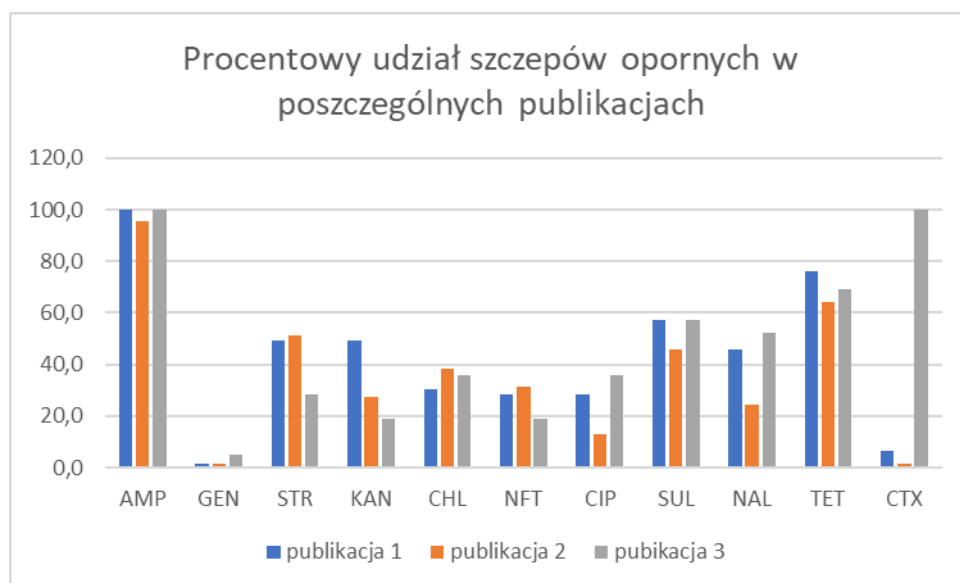


4.3 Określenie minimalnego stężenia hamującego

Analizę lekowrażliwości przeprowadzono sumarycznie na 175 izolatach *E. coli* (wszystkie 3 grupy badawcze). Bez względu na grupę badawczą, wiodącą była oporność na ampicylinę (n=172, 98,3%), tetracyklinę (n=122, 69,7%) oraz sulfametoksazol (n=92, 52,6%). Spośród aminoglikozydów szczepy wykazywały największą oporność na streptomycynę (n=79, 45,1%), następnie kanamycynę (n=58, 33,1%), natomiast tylko cztery izolaty wykazywały oporność wobec gentamycyny. Aż 61 izolatów (34,9%) wykazywało oporność na chloramfenikol, a 48 (27,4%) na nitrofurantoinę. Oporność na kwas nalidyksowy kształtowała się na poziomie 38,9%, przy czym w przypadku izolatów o fenotypie CR oraz u szczepów wyizolowanych od zwierząt mięsożernych średnio co drugi szczep był niewrażliwy na ten środek przeciwdrobnoustrojowy. Na ciprofloksacynę odporne były 42 izolaty (24%), jednakże największy udział szczepów opornych na fluorochinolony zaobserwowano wśród szczepów opornych na cefalosporyny (35,7%). Ze względu na charakter publikacji 3 oporność na cefotaksym występowała u wszystkich badanych szczepów, natomiast spośród izolatów badanych w publikacji nr 1 (od zwierząt mięsożernych) uzyskano cztery szczepy odporne na cefotaksym, a wśród izolatów uzyskanych od zwierząt wszystkożernych i roślinożernych zaledwie jeden szczep prezentował oporność na III generację cefalosporyn.

Fenotyp wielolekooporny zaobserwowano u 123 izolatów, co stanowi 70,3% wszystkich analizowanych izolatów. Procentowy udział szczepów wielolekoopornych w poszczególnych grupach badawczych kształtował się na zbliżonym poziomie (Ryc. 2).

Rycina 2. Procentowy udział szczepów *E. coli* opornych na badane środki przeciwdrobnoustrojowe w poszczególnych grupach badawczych: zwierzęta mięsożerne (publikacja 1), zwierzęta wszystkożerne i roślinożerne (publikacja 2), szczepy cefotaksymoporne (publikacja 3).



4.4 Występowanie genów oporności

Oporność szczepów na tetracyklinę została potwierdzona obecnością genu *tetA* (n=76, 44,2%), genu *tetB* (n=32, 18,6%) lub jednocześnie obydwu tych genów (n=11, 6,4%). U 53 szczepów tetracyklinoopornych (30,8%) nie wykryto obecności żadnego z badanych genów. Oporność na sulfametoksazol była uwarunkowana w większości przypadków obecnością genu *sul2* (n=49, 53,3%) lub jednocześnie genów *sul1* i *sul2* (n=25, 27,2%). Nieliczne izolaty miały pojedynczy gen *sul1* (n=6, 6,5%), lub *sul3* (n=5, 5,4%). Obecność genu *sul1* i *sul3* jednocześnie stwierdzono u dwóch izolatów (2,2%), a *sul2* i *sul3* u czterech izolatów (4,3%). Trzy badane geny *sul1*, *sul2* i *sul3* zostały wykryte jednocześnie u jednego szczepu *E. coli* (1,1%). Geny oporności na sulfametoksazol zostały wykryte w każdym szczepie opornym na ten lek. Badane szczepy charakteryzowały się dużą różnorodnością genów warunkujących oporność na fenikole. Najczęściej występował gen *floR*, samodzielnie w 12 przypadkach (19,7%) lub z genem *cmlA* u dziewięciu izolatów (14,8%) lub z genem *cat* u trzech szczepów (4,9%). Pojedynczy gen *cmlA* wykryto u 15 izolatów (24,6%), a gen *cat* u 10 (16,4%). W przypadku pojedynczego szczepu symultanicznie występowały geny *cmlA* i *cat* (1,6%), jak również w

jednym izolacie występowały wszystkie trzy geny jednocześnie (1,6%). U dziesięciu izolatów opornych na chloramfenikol nie zidentyfikowano żadnego z badanych genów (Tabela 4).

Za oporność na kanamycynę w większości izolatów odpowiadał gen *aph(3')-Ia* (n=41, 70,7%). Tylko w dwóch szczepach zidentyfikowano gen *aph(3')-IIa* (3,4%). Gen *aac(3)-II* warunkujący oporność na gentamycynę został wykryty u dwóch izolatów (50%). Oporność na streptomycynę była wynikiem ekspresji pojedynczego genu *strA* u 58 szczepów opornych z publikacji 1 i 2 (86,6%). Obecności genu *strA* nie wykryto u dziewięciu izolatów (13,4%). W publikacji nr 3 dodatkowo zbadano występowanie genów *strB* oraz *aad*. U szczepów badanych w tej publikacji, oporność na streptomycynę wynikała najczęściej z obecności kilku genów jednocześnie. Geny *strA* i *strB* występowały jednocześnie u pięciu szczepów (41,7%), geny *strA*, *strB* i *aad* jednocześnie u trzech szczepów (25%) oraz u pojedynczego izolatu odnotowano obecność genów *strB* i *aad* (8,3%). Jeden ze szczepów opornych miał pojedynczy gen *aad* (8,3%).

W publikacji 3 dodatkowo oceniono występowanie genów PMQR odpowiedzialnych za kodowaną na plazmidach oporność na fluorochinolony. Geny PMQR wykryto u 11 izolatów na 42 badane (26,2%), jednakże tylko u sześciu z nich obecność genu wiązała się z fenotypową opornością na ciprofloksacynę. Pozostałe pięć szczepów nie osiągnęło granicznej wartości klinicznej 2 µg/ml zgodnie ze standardem CLSI przyporządkowującej badany szczep jako co najmniej średniowrażliwy. Najczęściej występował gen *qnrS*, obecny u pięciu izolatów (45,5%). Gen *aac(6')-Ib* odnotowano u trzech szczepów (27,3%), natomiast gen *qnrB* u dwóch (18,2%). Jeden szczep posiadał gen *qep* (9,1%). Żaden z badanych szczepów nie posiadał genu *qnrA* ani *qnrC*.

W publikacji nr 1, zaledwie trzy szczepy wykazywały fenotyp ESBL. Sekwencjonowanie potwierdziło występowanie genów: *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1}* i *bla_{TEM-135}*. W publikacji nr 2 tylko jeden szczep wykazywał obecność genu *bla_{CTX-M-27}*, zatem w obu publikacjach nie wykazano izolatów wytwarzających cefalosporynazy AmpC. Natomiast w publikacji nr 3, spośród 42 badanych izolatów aż 11 posiadało geny odpowiedzialne za produkcję AmpC beta-laktamaz. Po przeprowadzeniu sekwencjonowania potwierdzono obecność genu *bla_{CMY-2}*. Pozostałe szczepy charakteryzował fenotyp ESBL, jednakże jeden ze szczepów posiadał jednocześnie geny ESBL i AmpC. Szczep izolowany od lisa rudego nr 28 CEF w badaniu metodą podwójnej dyfuzji nie wykazał różnicy w średnicach stref dla cefotaksymu z kwasem klawulanowym i

ceftazydymu z kwasem klawulanowym w stosunku do średnicy strefy zahamowania tylko cefotaksymu lub ceftazydymu, natomiast wykazał obecność trzech różnych genów: charakterystycznych dla producentów ESBL – *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-12}, a także AmpC - *bla*_{DHA-1}. Część szczepów o fenotypie ESBL miało pojedynczy gen, natomiast pozostałe charakteryzowały się obecnością dwóch genów (n=12). W większości przypadków wykryto obecność genu *bla*_{TEM} symultanicznie z genem *bla*_{CTX-M-1} lub z genem *bla*_{CTX-M-9}. Spośród genów kodujących enzymy z grupy CTX-M-9 po sekwencjonowaniu amplikonów otrzymano następujące geny: *bla*_{CTX-M-27} u dwóch szczepów, *bla*_{CTX-M-14} u dwóch szczepów oraz *bla*_{CTX-M-65} u pojedynczego izolatu. Gen *bla*_{SHV-12} występował u dwóch izolatów *E. coli*. U jednego występował wraz z genem *bla*_{TEM}, a u drugiego z genem *bla*_{CTX-M-1} i *bla*_{DHA-1}.

Tabela 4. Zestawienie obecności wybranych genów oporności u szczepów *E. coli* w poszczególnych grupach badawczych.

Środek przeciwdrobnoustrojowy	Badane geny oporności	Grupa zwierząt mięsożernych (publikacja nr 1)	Grupa zwierząt wszystkożernych i roślinożernych (publikacja nr 2)	Szczepy cefalosporyno-oporne (publikacja nr 3)	SUMA
tetracyklina	<i>tetA</i>	28	30	18	76
	<i>tetB</i>	15	9	8	32
	<i>tetA</i> + <i>tetB</i>	6	4	1	11
sulfametoksazol	<i>sul1</i>	2	3	1	6
	<i>sul2</i>	19	18	12	49
	<i>sul3</i>		3	2	5
	<i>sul1</i> + <i>sul2</i>	13	5	7	25
	<i>sul1</i> + <i>sul3</i>	2			2
	<i>sul2</i> + <i>sul3</i>	1	2	1	4
	<i>sul1</i> + <i>sul2</i> + <i>sul3</i>		1		1
chloramfenikol	<i>cmlA</i>	6	6	3	15
	<i>cat</i>	4		6	10
	<i>floR</i>	5	7		12
	<i>cmlA</i> + <i>cat</i>		1		1
	<i>cmlA</i> + <i>floR</i>	1	7	1	9
	<i>cat</i> + <i>floR</i>	2	1		3

	<i>cmlA + cat + floR</i>		1		1
kanamycyna	<i>aph(3')- Ia</i>	26	7	8	41
	<i>aph(3')- IIA</i>	1	1		2
streptomycyna	<i>strA</i>	31	27		58
	<i>strB</i>	Nb	Nb		
	<i>Aad</i>	Nb	Nb	1	1
	<i>strA + strB</i>	Nb	Nb	5	5
	<i>strA + aad</i>	Nb	Nb		
	<i>strB + aad</i>	Nb	Nb	1	1
	<i>strA + strB + aad</i>	Nb	Nb	3	3
gentamycyna	<i>aac(3)-II</i>	1	1		2
	<i>aac(3)-III</i>				

Nb – nie badano

4.5 Występowanie genów wirulencji

Na podstawie oceny profili występowania genów charakterystycznych dla poszczególnych patotypów, badane szczepy *E. coli* przypisano do jednego z czterech: EPEC, ETEC, EHEC lub ExPEC. Występowanie genów wirulencji zostało ocenione w publikacji 2 i 3. Wśród przebadanych izolatów sumarycznie znaleziono zaledwie dziewięć, które udało się przypisać do patotypu. Dominującym był patotyp ExPEC, do którego zaklasyfikowano pięć szczepów. Wszystkie szczepy posiadały gen *papC*, większość symultanicznie z genem *papAH* i *kpsMTIII* i/lub *iutA*. U jednego szczepu dodatkowo odnotowano obecność genów *sfa/foc* oraz *hlyA*. Dwa izolaty zostały zaklasyfikowane do patotypu ETEC ze względu na obecność co najmniej jednego genu kodującego wytwarzanie stabilnych termicznie toksyn: STa i STb. Dwa inne szczepy wykazywały patotyp EHEC ze względu na obecność genów kodujących Shiga-toksynę².

4.6 Analiza typów sekwencyjnych w oparciu o technikę MLST

W publikacji nr 3 przeprowadzono analizę podobieństwa szczepów metodą MLST. W wyniku analizy otrzymano 28 różnych typów sekwencyjnych, a niektóre z nich udało się przypisać do kompleksów klonalnych. Najliczniej występował kompleks klonalny ST10, do którego zaklasyfikowano sześć szczepów o następujących typach sekwencyjnych: ST10980, ST10, ST746 i ST744. Do kompleksu klonalnego ST155 zaklasyfikowane zostały dwa typy

sekwencyjne: ST155 i ST683. Kompleks klonalny ST23 został wykryty u trzech izolatów o typach sekwencyjnych ST88, ST1615 i ST23. Kompleks ST69 występował u trzech szczepów wyizolowanych od lisów. U pojedynczych szczepów oznaczono również następujące kompleksy klonalne: ST446, ST101, ST354, ST398 i ST168.

Wysokie zróżnicowanie szczepów występowało wśród 37 szczepów pochodzących od lisów. W tej grupie próbek oznaczono 26 typów sekwencyjnych. Dominował typ ST2178, ST69 i ST10. Po dwa izolaty należały do: ST2598, ST117 i ST683. Pozostałe wykazane typy sekwencyjne cechowały pojedyncze szczepy.

Wszystkie izolaty pochodzące od norek należały do jednego typu sekwencyjnego ST156. Pojedyncze szczepy wyizolowane od kaczki krzyżówki i od ślimaka winniczka miały typy sekwencyjne odpowiednio: ST1486 i ST1196.

5. Dyskusja

W pracach nr 1 i 2, izolację szczepów *E. coli* opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe przeprowadzono z łącznie 161 wymazów pochodzących od różnych gatunków zwierząt wolno żyjących. Wymazy podzielono na dwie grupy: zwierzęta mięsożerne (publikacja 1) oraz zwierzęta wszystkożerne i roślinożerne (publikacja 2) celem określenia czy rodzaj diety zwierząt może wpływać na stopień nosicielstwa szczepów lekoopornych. W związku z powyższym w obu pracach zastosowano taką samą metodykę. Wśród zwierząt drapieżnych odnotowano wyższy stopień izolacji szczepów opornych na co najmniej jeden antybiotyk (71,6%) w porównaniu ze zwierzętami wszystkożernymi i roślinożernymi (50,9%). Prawdopodobnie rodzaj diety może mieć wpływ na poziom i zróżnicowanie lekooporności. Znacznie większa różnorodność spożywanego pokarmu przez grupę zwierząt mięsożernych, związana z dużym zróżnicowaniem gatunkowym (między innymi małych ssaków, ptaków, ryb, płazów i padliny) determinuje wyższy poziom lekooporności wśród izolatów *E. coli* pochodzących od zwierząt drapieżnych. Będąc na szczycie łańcucha pokarmowego mogą one kumulować szczepy odporne, tym samym zwiększając ich zmienność oraz możliwość rozprzestrzeniania się (Nhung i wsp., 2015; Smith i wsp., 2014).

Wyniki uzyskane przez mnie w obydwu pracach znacznie przewyższają odsetek tego typu izolatów, notowany przez innych autorów, zarówno w Polsce jak i na świecie (Turchi i wsp., 2019; Wasyl i wsp., 2018; Literak i wsp., 2010; Costa i wsp., 2008). We wszystkich cytowanych pracach odsetek izolatów opornych w zależności od gatunku badanych zwierząt wynosił od kilku (6-6,6%) do kilkudziesięciu, przekraczając w przypadku najwyższej oporności na dany lek nie więcej niż 35%. Wysoki stopień izolacji szczepów opornych na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy w moich pracach jest wynikiem zastosowania niestandardowego podejścia do badań na etapie izolacji szczepów. Do izolacji bakterii z próbek zwierzęcych wykorzystano cztery kombinacje podłoża MacConkey agar (dedykowanego głównie wybiórczej izolacji pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*) suplementowanego wytypowanym antybiotykiem (cefotaksym, chloramfenikol, kanamycyna, tetracyklina). Stosowanie podłoży w celu wybiórczej izolacji lekoopornych izolatów nie tylko należących do gatunku *E. coli* było już wielokrotnie opisywane (Nowakiewicz i wsp., 2020a; Nowakiewicz i wsp., 2020b). Szczególnie często tego typu izolacja ukierunkowana wykorzystywana jest w wykrywaniu szczepów lekoopornych, stanowiących potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego (*E. coli* oporna na cefalosporyny czy *Enterococcus faecium* odporne na

wankomycynę). Niemniej w przypadku moich badań zastosowałam cztery różne antybiotyki, ustalając stężenie każdego z nich na poziomie odpowiadającym zaklasyfikowaniu każdego uzyskanego na danym podłożu izolatu jako co najmniej średniowrażliwy (zgodnie z kryteriami wskazanymi przez CLSI). Wybrane do badania antybiotyki zostały wytypowane w oparciu o określone kryteria, związane ze znaczeniem danego typu oporności dla potencjalnego zagrożenia zdrowia publicznego (oporność na III generację cefalosporyn), wysoki odsetek oporności na tetracyklinę wśród szczepów szpitalnych i izolowanych od zwierząt oraz szerokie stosowanie aminoglikozydów (szczególnie neomycyny, na którą *E. coli* wykazuje krzyżową oporność z kanamycyną oraz fenikoli (głównie florfenikolu) w produkcji zwierzęcej (EFSA 2021).

Zastosowanie kilku podłoży na początkowym etapie analiz oprócz zwiększenia prawdopodobieństwa izolacji większej liczby lekoopornych szczepów, zwiększa jednocześnie prawdopodobieństwo uzyskania przykładowo na wszystkich czterech podłożach z tej samej próbki, tego samego klonu, opornego na wszystkie substancje przeciwbakteryjne wykorzystane w procesie izolacji. Aby uniknąć przeszacowania wyników, w kolejnym etapie zastosowałam wstępnie metodę dyfuzyjno-krażkową celem określenia i porównania fenotypowych profili oporności izolatów pochodzących z tej samej próbki, a następnie jedną z metod genotypowania opartą o analizę całkowitego genomowego DNA badanego szczepu.

Zastosowana przez mnie sekwencja badawcza ma jednak również pewne ograniczenia, związane z ryzykiem nie wykazania lub wykazania w znacznie mniejszym odsetku izolatów opornych na substancję, która nie została wykorzystana w podłożach do izolacji wybiórczej. Niemniej biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku większości mechanizmów oporności, przenoszone są one na drodze wymiany horyzontalnej, najczęściej jako więcej niż jeden gen na określonym plazmidzie lub transpozonie (Wu i wsp., 2010). Przykładowo Nojoomi i wsp. (2018) wykazali dodatnią korelację pomiędzy występowaniem genów kodującymi oporność na tetracykliny, fluorochinolony i fenikole w genomie określonego szczepu, co wiąże się również często z ekspresją oporności danego szczepu na te same substancje przeciwbakteryjne.

Z drugiej strony taka procedura pozwala również na nieograniczone modyfikowanie i dobór substancji przeciwbakteryjnych, które chcemy wykorzystać w badaniu, w zależności od badanej grupy zwierząt lub zakresu stosowanych (i dopuszczonych) grup substancji przeciwbakteryjnych w danym kraju lub u danej grupy zwierząt. Zwierzęta wolno żyjące na

ogół nie są poddawane procesom leczniczym, więc w tym przypadku, trudno było określić najbardziej prawdopodobny zakres oporności. Jednak bazując na dotychczas uzyskanych wynikach wskazujących również na wysoki udział szczepów opornych na fluorochinolony w biocie przewodu pokarmowego zwierząt wolno żyjących, kolejne realizowane przeze mnie badania będą również obejmowały wybiórczą izolację szczepów *E. coli* opornych na tę grupę leków.

Analizując uzyskane wyniki dotyczące oporności badanych szczepów na cefotaksym, pomimo zastosowania podłoża wybiórczych, wykazałam dość niski ich udział wśród szczepów *E. coli* izolowanych od zwierząt wolno żyjących. W przypadku pracy nr 1 i 2 u zwierząt mięsożernych były to cztery izolaty (7,5% wszystkich badanych w tej grupie), a u zwierząt wszystkożernych i roślinożernych jedynie wykazałam jeden oporny szczep (0,9%). Natomiast w przypadku ostatniej publikacji, w której w grupie badawczej przeważały lisy rude, odsetek szczepów opornych na cefalosoryny wynosił 10,5%. Dodatkowo na późniejszym etapie u wszystkich szczepów, które urosły na podłożu z cefotaksymem wykazałam obecność adekwatnych genów oporności odpowiadających za fenotypową oporność na cefalosporyny. Taki wynik może wskazywać na właściwy dobór metody i stężeń substancji i prawidłowe przeprowadzenie procesu izolacji.

Proces weryfikacji identycznych izolatów w tej samej próbce był dwuetapowy. Wstępnie zastosowałam metodę dyfuzyjno-krażkową z wykorzystaniem sześciu różnych substancji przeciwbakteryjnych wykorzystując jako kryterium różnicę w profilu oporności na dwie lub więcej substancji przeciwdrobnoustrojowych. Ten etap pozwolił na wstępne określenie oporności szczepów i eliminację izolatów o tych samych profilach oporności uzyskanych z tej samej próbki. Okazało się jednak, że ze względu na duże zróżnicowanie szczepów, metoda pozwoliła na odrzucenie zaledwie kilkunastu izolatów. Uzyskany wynik dużej różnorodności szczepów został potwierdzony również kolejną metodą (ADSRRS-fingerprinting), w której w każdej grupie badawczej wyodrębniłam po kilkadziesiąt różnych profili genomowych, biorąc pod uwagę kryterium zróżnicowania na poziomie $< 90\%$. W przypadku zwierząt drapieżnych, zaledwie w trzech kolejnych parach szczepów pochodzących od tego samego osobnika, wykazałam podobieństwo na poziomie $>90\%$ i zaklasyfikowałam je do tego samego genotypu, niemniej jak później wykazałam w kolejnym etapie w dwóch parach szczepów, oba izolaty danej pary posiadały te same geny, ale jeden z nich najczęściej dodatkowo zawierał jeszcze dwa, trzy inne, dlatego na etapie analizy metodą dyfuzyjno-krażkową, szczepy te cechował inny

profil lekooporności. Podobną sytuację zaobserwowałam w grupie szczepów analizowanych w pracy nr 2; wykazałam jedną parę szczepów izolowanych od wiewiórki na poziomie 100% podobieństwa i dwie pary szczepów izolowanych od saren, które analogicznie jak w przypadku szczepów od zwierząt mięsożernych, cechowało podobieństwo na poziomie 90%, ale jeden ze szczepów w każdej parze różnił się od drugiego obecnością dodatkowych genów oporności, co przełożyło się na fenotypowe zróżnicowanie profilu oporności. Uzyskany wynik potwierdza celowość zastosowania obu metod w przypadku odrzucenia identycznych izolatów pochodzących z tej samej próbki, z drugiej jednak strony zastosowana metodyka pozwoliła również na wykazanie identycznych izolatów u różnych osobników; szczepy na poziomie podobieństwa $\leq 90\%$ wyizolowano od dwóch różnych jenotów, dwóch różnych norek i dwóch różnych osobników należących do gatunku jelen szlachetny. Ze względu na brak precyzyjnych danych odnośnie dokładnej lokalizacji zwierząt, od których pobrano materiał, uzyskane wyniki pozwalają jedynie przypuszczać, że zwierzęta korzystały z tych samych zasobów pokarmowych lub były ze sobą blisko spokrewnione lub pochodziły z jednego stada, co sprzyjało przeniesieniu określonego szczepu na kolejne zwierzę. Niemniej taka obserwacja wydaje się potwierdzać zjawisko aktywnego rozprzestrzeniania się lekooporności wśród zwierząt wolno żyjących, a biorąc pod uwagę, że szczepy z tej grupy cechowała wielolekooporność, proces ten postępuje dość szybko i na dużą skalę.

Inną prawidłowością zaobserwowaną dzięki wykorzystaniu metody ADSRRS-fingerprinting, dodatkowo potwierdzającą dużą dynamikę szerzenia się wielolekooporności wśród szczepów mikrobiomu jelitowego zwierząt wolno żyjących, było wykazanie u dużego odsetka badanych zwierząt, obecności co najmniej dwóch różnych szczepów *E. coli*, różniących się od siebie zarówno genotypem (podobieństwo $< 90\%$), jak i profilem genów. U obu badanych grup zwierząt wykazano nosicielstwo więcej niż jednego szczepu u danego osobnika (dwa lub trzy różne szczepy izolowane z tej samej próbki), w większości przypadków cechujące się wielolekoopornością. Uzyskany przeze mnie wynik nie tylko potwierdza ogromne zróżnicowanie pod względem profilu lekooporności *E. coli* zasiedlających przewód pokarmowy danego zwierzęcia, ale również celowość zastosowanej metody izolacji i analizy. W przypadku standardowo prowadzonych badań monitoringowych drobnoustrojów izolowanych od wybranych grup zwierząt stanowiących źródło żywności pochodzenia zwierzęcego, zgodnie ze zharmonizowanym protokołem, do badania typowany jest tylko jeden izolat pochodzący od danego zwierzęcia, uzyskany na podłożu bez suplementacji leku (wybór

losowy) (EFSA, 2021). Przy tego typu analizie możliwa jest ocena w stosunku 1:1, natomiast wynik nie daje odpowiedzi czy zwierzę nie jest nosicielem większej liczby zróżnicowanych pod względem lekooporności szczepów. Ponadto przy losowej strategii wyboru pojedynczego szczepu zawsze istnieje ryzyko, że badający do analizy wytypuje szczep w pełni wrażliwy na wszystkie badane leki, co może spowodować niedoszacowanie wyniku i poziomu rzeczywistej oporności. Natomiast wyniki, które uzyskałam w swoich badaniach potwierdzają bardzo szeroki, zróżnicowany i wielokierunkowy profil lekooporności szczepów izolowanych od wszystkich gatunków zwierząt wolno żyjących, pomimo, że nie są i nie były one na ogół poddawane leczeniu środkami przeciwdrobnoustrojowymi.

Bez względu na gatunek badanych zwierząt, wśród badanych szczepów uzyskano podobny, dość wysoki poziom izolatów wielolekoopornych wynoszący ponad 70%. Uzyskany wynik u zwierząt mięsożernych prawdopodobnie jest efektem kumulowania genów oporności na każdym z poziomów łańcucha pokarmowego oraz większą różnorodnością spożywanego pokarmu u tej grupy zwierząt. Zwierzęta takie jak lisy, norki, czy kuny charakteryzują się również wysokim potencjałem synantropizacji. W ostatnich latach co raz częściej nierzadki jest widok zwierząt należących do gatunków do tej pory związanych raczej ze środowiskiem sylwatyicznym, na terenach zurbanizowanych, tj. na obrzeżach miast lub mniejszych miejscowości, w których np. zlokalizowane są farmy zwierząt gospodarskich. Wynika to z faktu, że zwierzęta te znajdują w takich miejscach łatwo dostępne zasoby żywności (np. śmietniki) lub ich dotychczasowe trasy wędrówek lub tereny łowieckie zostały przekształcone przez człowieka. Na tym etapie może zachodzić dwukierunkowa wymiana oporności, zarówno na poziomie drobnoustrojów jak i ich genomów, powodująca nabywanie nowych lekoopornych szczepów i dalsze ich rozprzestrzenianie przez zwierzęta w środowisku naturalnym. Zjawisko to potwierdzają również wyniki, które uzyskałam w pracy nr 3. Obecność szczepów wielolekoopornych u lisa rudego wydaje się być naturalną konsekwencją opisanych powyżej zjawisk, niemniej już wykazanie szczepu jednocześnie wielolekoopornego i opornego na cefalosporyny III generacji, potwierdza możliwość dość wysokiego poziomu kontaminacji środowiska naturalnego, być może na skutek rozprzestrzeniania lekooporności przez zwierzęta drapieżne, które nabyły ją w wyniku kontaktu ze zurbanizowanym środowiskiem człowieka. Z drugiej strony dla zwierząt roślinożernych potencjalnym źródłem szczepów wielolekoopornych jest kontakt z zanieczyszczonym środowiskiem, przede wszystkim spożywanymi roślinami oraz wodą (Kotlarska i wsp., 2015).

Wśród wszystkich przebadanych izolatów dominował podobny profil oporności, tj. oporność na ampicylinę, tetracyklinę i/lub sulfametoksazol i utrzymywał się na podobnych poziomach odpowiednio: 98,3%, 69,7% i 52,6%. Oporność na aminoglikozydy była zróżnicowana w poszczególnych grupach badawczych. Szczepy odporne na kanamycynę stanowiły wśród izolatów pochodzących od zwierząt mięsożernych (publikacja 1) 49,2%. Nieco mniejszy udział szczepów opornych na ten lek zaobserwowano wśród zwierząt roślinożernych i wszystkożernych. Najmniejszy ich udział odnotowano u szczepów opornych na cefalosporyny, co prawdopodobnie mogło być związane z ukierunkowaną izolacją szczepów wyłącznie opornych na cefalosporyny, natomiast w pozostałych dwóch przypadkach, prowadzono izolację wybiórczą również na podłożu z kanamycyną. Oporność na gentamycynę była znikoma we wszystkich grupach badawczych i zanotowano ją w zaledwie jednym lub dwóch szczepach w każdej puli badawczej. Podobnie jak w przypadku kanamycyny, oporność na streptomycynę u szczepów cefalosporyno-opornych była niższa o prawie 12% niż u pozostałych badanych izolatów. Jest to o tyle ciekawe zjawisko, że w badaniach nie prowadzono wybiórczej izolacji w kierunku oporności na streptomycynę, natomiast odsetek szczepów opornych na kanamycynę i streptomycynę był porównywalny, pomimo różnych mechanizmów molekularnych odpowiadających za oba rodzaje oporności. W literaturze opisywane są doniesienia o współwystępowaniu genów oporności na cefalosporyny z genami oporności na aminoglikozydy (Athanasakopoulou i wsp., 2021; Bodendoerfer i wsp., 2020), niemniej w naszych badaniach szczepy odporne na cefalosporyny w porównaniu do izolatów pochodzących od innych gatunków zwierząt wykazały najniższy stopień oporności na aminoglikozydy.

Fenotypowa oporność na chinolony i fluorochinolony była największa u szczepów cefalosporyno-opornych i kształtowała się na podobnym poziomie jak u zwierząt mięsożernych (30% vs 28%). Najniższy odsetek szczepów niewrażliwych na tę grupę leków zanotowano u izolatów pochodzących od zwierząt wszystkożernych i roślinożernych. Wysoki udział szczepów opornych na te chemioterapeutyki u zwierząt mięsożernych (praca nr 1 i 3) może świadczyć o większym zróżnicowaniu źródeł takich izolatów dostępnych w pożywieniu (kolejne ogniwa łańcucha pokarmowego), szczególnie, że w przypadku oporności klinicznej (określonej w moich badaniach na poziomie $MIC \geq 4 \mu g/ml$), pojawia się ona w wyniku zjawiska mutacji, więc w tym przypadku raczej jest to wynik kontaktu zwierząt ze zróżnicowaną pulą bakterii, prawdopodobnie z dużym udziałem szczepów opornych na fluorochinolony wcześniej poddanych presji selekcyjnej.

Ciekawym zjawiskiem zaobserwowanym przeze mnie była znacząco wyższa (38%) oporność na fenikole w grupie zwierząt roślinożernych i wszystkożernych w porównaniu z pozostałymi grupami badawczymi (około 20-23%). Tak wysoki poziom oporności jest porównywalny z wynikami uzyskiwanymi w badaniach oporności wśród szczepów izolowanych od zwierząt gospodarskich i człowieka (Szmolka i Nagy, 2013). Być może w pewnym stopniu można to zjawisko wyjaśnić wysokim udziałem genu odpowiedzialnego za fenotypową oporność na chloramfenikol i florfenikol w tej grupie izolatów. Florfenikol jest lekiem używanym szeroko w produkcji zwierzęcej (Szmolka i Nagy, 2013; Bischoff i wsp., 2005), a jego pozostałości mogą dostawać się do środowiska i powodować pojawianie się presji selekcyjnej (Robles-Jimenez i wsp., 2022).

Profile oporności wyizolowanych szczepów *E. coli* zostały w większości przypadków potwierdzone występowaniem wybranych determinant oporności.

We wszystkich trzech publikacjach oporność na tetracyklinę była uwarunkowana przede wszystkim ekspresją genu *tetA*, następnie *tetB* lub współwystępowaniem obu tych genów jednocześnie. Literatura wskazuje, iż oporność na tetracyklinę u *E. coli* jest uwarunkowana obecnością różnych genów odpowiedzialnych za aktywne usuwanie tetracykliny poza komórkę (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetJ*, *tetL* i *tetY*), obecnością genów kodujących białka chroniące rybosomy (*tetM* i *tetW*) oraz występowaniem genu kodującego oksydoreduktazę inaktywującą tetracykliny (gen *tetX*) (Karami i wsp. 2006). Głównymi mechanizmami oporności na tetracykliny u szczepów *E. coli* pochodzenia zwierzęcego jest natomiast aktywne wypompowywanie antybiotyku poza komórkę, wspomagany białkiem z grupy MFS (ang. Major facilitator superfamily) oraz ochrona rybosomów (Poirel i wsp. 2018). Ze względu na dane literaturowe, wskazujące, że najczęściej występującymi genami są *tetA* i *tetB* w swoich badaniach sprawdzałam obecność tylko tych dwóch genów (Shin i wsp., 2015). Dominację tych genów wykazano również wśród szczepów *E. coli* izolowanych od dzikiego ptactwa (Skarżyńska i wsp., 2021) oraz drobiu w Polsce (Ćwiek i wsp., 2021) i od zwierząt hodowlanych na świecie (Shin i wsp., 2015; Jurado-Rabadán i wsp., 2014).

Wśród izolatów pochodzących od badanych zwierząt wolno żyjących, oporność na sulfonamidy uwarunkowana była głównie obecnością genu *sul2* lub współwystępowania genu *sul1* i genu *sul2*. Sumarycznie na 92 szczepy odporne gen *sul2* zidentyfikowano u 49 szczepów, natomiast jednocześnie gen *sul1* i *sul2* występował u 25 izolatów opornych na sulfametoksazol.

Gen, *sul3* rzadko występował pojedynczo, podobnie jak w parze z innymi genami *sul*; zaobserwowano jedynie pojedyncze szczepy o takim genotypie. Gen *sul3* został po raz pierwszy wykazany w 2003 roku przez Perreten i Boerlin (2003) w szczepach *E. coli* izolowanych od świń, natomiast już publikacje z ostatnich lat donoszą o obecności tego genu u pojedynczych szczepów izolowanych od zwierząt wolnożyjących (Ong i wsp., 2020). Obecność genów *sul1*, *sul2* i *sul3* jest charakterystyczna dla izolatów *E. coli* opornych na sulfonamidy i jest to podstawowy mechanizm oporności na te środki przeciwdrobnoustrojowe. Najczęściej identyfikowane były dwa mechanizmy nabytej oporności: modyfikacje mutacyjne w genach, które kodują enzymy docelowe: syntazę dihydropterynianową oraz reduktazę dihydrofolianową, lub poprzez nabycie wspomnianych wcześniej genów *sul* kodujących syntetazę dihydropterynianową niewrażliwą na sulfonamidy lub genów *dfr* kodujących reduktazę dihydrofolianową niewrażliwą na trimetoprim (Poirel i wsp., 2018).

Wśród izolatów *E. coli* pochodzących od zwierząt zarówno wolno żyjących jak i gospodarskich oraz człowieka, to gen *sul1* jest szczególnie rozpowszechniony, ponieważ jest on częścią integronów klasy 1. Lokalizacja genu *sul1* na integronie klasy 1 sprawia, że jest on często identyfikowany razem z innymi genami warunkującymi oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (Wu i wsp., 2010). Podobnie, gen *sul2* również jest często wykrywany jako przyczyna oporności u izolatów *E. coli* na całym świecie (Boerlin i wsp., 2005). Gen *sul2* jest zlokalizowany na plazmidach zawierających geny oporności na streptomycynę *strA* i *strB* (Touzain i wsp., 2018). Natomiast gen *sul3* może współwystępować z genami oporności na makrolidy *mefB* (Liu i wsp., 2009). Dominację genu *sul2* (31,2%) zauważono także w przypadku izolatów pochodzących od różnych gatunków dzikich ptaków w Polsce (Nowaczek i wsp., 2021). Z kolei Ćwiek i wsp. (2021) stwierdzili taki sam udział genu *sul1* co genu *sul2* u szczepów *E. coli* opornych na sulfonamidy izolowanych od drobiu w Polsce.

Oporność na kanamycynę u badanych izolatów związana była głównie z ekspresją genu *aph(3')-Ia*, który zidentyfikowano u 41 izolatów na 58 szczepów opornych. Gen *aph(3')-IIa* występował tylko u dwóch szczepów izolowanych od jenota i wiewiórki. Taka proporcja genów determinujących fenotypową oporność na kanamycynę jest charakterystyczna również dla izolatów pochodzących od zwierząt gospodarskich (Yamamoto i wsp., 2013). Oporność molekularna na streptomycynę była zróżnicowana. W publikacji pierwszej i drugiej badano tylko obecność jednego z genów warunkujących oporność na ten środek przeciwdrobnoustrojowy i był to gen *strA*; jego występowanie potwierdzono u większości

szczepów streptomycynoopornych (58 izolatów na 67 opornych). Niemniej pomimo fenotypowej oporności na ten aminoglikozyd, u dziewięciu szczepów nie potwierdzono mechanizmu oporności odpowiedzialnego za ten typ oporności. Dlatego w publikacji nr 3, dotyczącej cefalosporyno-opornych szczepów *E. coli* dodatkowo sprawdzono występowanie genów *strB* oraz *aad*. W tym przypadku wyniki pokazały, że oporność na streptomycynę związana jest z występowaniem co najmniej dwóch genów *strA* i *strB* (n=5), lub tylko genu *strB* i *aad* (n=1) lub wszystkich trzech badanych genów: *strA*, *strB* i *aad* jednocześnie (n=3). Tylko jeden szczep posiadał pojedynczy gen *aad*. Pomimo rozbudowania panelu badanych leków nadal nie potwierdzono mechanizmu molekularnej oporności na streptomycynę dla pięciu szczepów, co może wskazywać na pojawienie się zupełnie nowych genów lub mutacji odpowiedzialnych za to zjawisko. Oporność na gentamycynę była niska wśród przebadanych izolatów. Gen *aac(3)-II* zidentyfikowano jedynie u dwóch izolatów, natomiast w przypadku szczepów dla których MIC wykazano na poziomie klasyfikującym szczep jako średniowrażliwy, geny nie zostały wykryte. Tak niski poziom oporności na gentamycynę jest bardzo pozytywnym wynikiem, szczególnie, że poziom lekooporności wśród szczepów klinicznych izolowanych np. od zwierząt towarzyszących nie podnosi się i waha w granicach 2-3%. Ponadto gentamycyna zgodnie z klasyfikacją leków zalecaną w postępowaniu terapeutycznym u małych zwierząt jest klasyfikowana do trzeciej grupy, obejmującej leki o szerokim spektrum, ale stosowane również w przypadkach ciężkich infekcji u człowieka (np. zapalenie wsierdza), dlatego jej stosowanie u zwierząt powinno mieć istotne wskazania (Jessen i wsp., 2019).

Oporność na aminoglikozydy jest związana z szeregiem różnego rodzaju mechanizmów, przede wszystkim z dezaktywacją enzymatyczną antybiotyków, przez co nie mogą one dotrzeć do miejsca docelowego i połączyć się z nim. Znane są co najmniej trzy rodzaje enzymów modyfikujących aminoglikozydy: acetylotransferazy, nukleotydylotransferazy i fosfotransferazy (Ramirez i wsp. 2010; Poirel i wsp. 2018). Każda z tych grup, podgrup, a nawet indywidualnych typów enzymów cechuje się możliwością generowania oporności na różne aminoglikozydy, przykładowo enzymy z grupy APH(3') determinują oporność na kanamycynę, neomycynę, paromomycynę, rybostamycynę czy liwidomycynę ale nie na inne aminoglikozydy, podobnie enzymy z grupy ANT(3'') ograniczają aktywność do wytworzenia oporności na streptomycynę, z kolei AAC (3') determinują oporność na gentamycynę, netylmycynę, tobramycynę, sisomycynę i dibekacynę, dlatego w przypadku analizy oporności

na aminoglikozydy należy często brać pod uwagę brak możliwości wystąpienia oporności krzyżowej (Ramirez 2010). Ze względu na tak duże zróżnicowanie mechanizmów oporności, również w moich badaniach wykazałam bardzo zróżnicowany poziom oporności na wybrane aminoglikozydy. Niewrażliwość na nie występowała bez wzajemnej zależności w badanych szczepach.

Rozmieszczenie genów *cmlA*, *cat* oraz *floR*, których ekspresja odpowiada za oporność na fenikole, było bardzo zróżnicowane wśród badanych szczepów *E. coli*, przy czym należy wspomnieć, że dwa pierwsze geny są odpowiedzialne za oporność na chloramfenikol, natomiast gen *floR* determinuje oporność również na florfenikol (Schwarz i wsp., 2004). Dlatego biorąc pod uwagę, że chloramfenikol nie jest lekiem stosowanym powszechnie u zwierząt (z wyjątkiem możliwości stosowania miejscowego u zwierząt towarzyszących), nie powinno dziwić, że dominującym genem był *floR* (występujący samodzielnie u 12 izolatów i u kolejnych dziewięciu jako współtowarzyszący genowi *cmlA*). Istnieje duże prawdopodobieństwo, że to właśnie pozostałości stosowanego u zwierząt florfenikolu dostające się do środowiska generują presję selekcyjną i szerzenie się oporności na fenikole.

Występowanie tych genów jest głównym mechanizmem fenotypowej oporności u szczepów *E. coli*. Oporność powstaje na skutek trzech głównych mechanizmów: aktywnego usuwania z komórki niefluorowanych fenikoli (obecność genu *cmlA*) lub fluorowanych i niefluorowanych fenikoli (ekspresja genu *floR*), inaktywacji enzymatycznej niefluorowanych fenikoli przy użyciu acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT) (ekspresja genu *cat*, w przypadku *E. coli*, głównie *catA*) oraz metylacja miejsca docelowego przez enzym metylazę rRNA (ekspresja genu *cfr*, którego nie badano w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej) (Schwarz i wsp., 2004)

Jedynie w publikacji nr 3 przebadano obecność genów oporności na fluorochinolony przenoszonych na drodze wymiany horyzontalnej (kodowanych na plazmidach (PMQR)). Wśród szczepów cefotaksymoopornych zaobserwowano wartość MIC₅₀ dla ciprofloksacyny (0,5 µg/ml) i kwasu nalidyksowego (32 µg/ml). Wszystkie 42 szczepy bez względu na wartość MIC zostały przebadane na obecność genów PMQR. W przypadku 11 szczepów wykazałam geny odpowiedzialne za PMQR, ale w przypadku sześciu szczepów, u których był obecny gen kodujący PMQR zaobserwowano wartość MIC na poziomie zaledwie od 0,06 do 1 µg/ml, co potwierdza zjawisko oporności na niskie stężenia fluorochinolonów w wyniku ekspresji genów

PMQR (Hooper i Jacoby, 2015). Jednakże pomimo, że nie analizowaliśmy obecności mutacji w QRDR (ang. quinolone resistance-determining region), oporność na wysoki poziom fluorochinolonów (≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) szczepów izolowanych od kun charakteryzujących się również obecnością genów PQMR sugeruje możliwość jednoczesnego występowania mutacji w QRDR i obecności genów determinujących PMQR. Akumulacja genów PMQR przy jednoczesnej obecności mutacji w regionie QRDR znacząco zwiększa wartości MIC dla fluorochinolonów i powoduje jeszcze większe trudności w leczeniu pacjentów w medycynie i weterynarii (Slette-meås i wsp., 2019).

Oporność na fluorochinolony u szczepów *E. coli* jest uwarunkowana występowaniem trzech głównych mechanizmów: występowania mutacji chromosomalnych prowadzących do modyfikacji enzymów docelowych, występowania mutacji chromosomalnych, na skutek których zmniejszeniu ulega akumulacja leku oraz obecności genów PMQR (Hooper i Jacoby, 2015).

W literaturze najczęściej określana jest obecność mutacji w genach *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE*, która jest związana z opornością na wysokie stężenie fluorochinolonów (Liu i wsp., 2012; Slette-meås i wsp., 2019). Jednakże w ostatnich latach obserwuje się zwiększenie ilości prac dotyczących badania genów PMQR u szczepów *E. coli*, u których wartość MIC nie przekracza 2 $\mu\text{g/ml}$ (Röderova i wsp., 2017; Dobiasova i Dolejska, 2016).

Dominacja genów *qnrS*, *aac(6')-Ib* oraz *qnrB* jest obserwowana także wśród szczepów izolowanych od człowieka, różnych gatunków zwierząt i próbek środowiskowych w innych krajach (Röderova i wsp., 2017; Slette-meås i wsp., 2019; Hu i wsp., 2017; Vieira i wsp., 2020) wykazała, że *E. coli* jest najczęściej raportowaną bakterią spośród Enterobacteriales niosącą geny PMQR.

Literatura światowa wskazuje na częste współwystępowanie genów PMQR wśród izolatów opornych na cefalosporyny (Araújo i wsp., 2017). Geny PMQR często są zlokalizowane na plazmidach wieloopornych, niosących jednocześnie oporność na fluorochinolony, cefalosporyny i inne grupy środków przeciwdrobnoustrojowych. Kindle i wsp. (2019) również zaobserwowali wysoki udział szczepów o fenotypie wielolekoopornym wśród izolatów opornych na fluorochinolony.

Oporność na trzecią generację cefalosporyn stanowi obecnie jeden z istotnych problemów związanych z narastającą lekoopornością. W 2017 roku Komitet Ekspertów Światowej

Organizacji Zdrowia (WHO) ds. Wyboru i Stosowania Leków Podstawowych opracował klasyfikację antybiotyków AWARe jako narzędzie ułatwiające stosowanie antybiotyków na poziomie lokalnym, krajowym i globalnym. Substancje przeciwbakteryjne zostały podzielone na trzy grupy: (ang Acces, Watch, Reserve), w oparciu o wpływ różnych antybiotyków i klas antybiotyków na kreowanie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Według powyższej klasyfikacji większość cefalosporyn III generacji, w tym cefotaksym znajduje się w grupie „Watch”. Zgodnie z wytycznymi WHO definicja mówi, że grupa ta obejmuje większość środków o najwyższym priorytecie wśród środków przeciwdrobnoustrojowych o znaczeniu krytycznym dla medycyny człowieka i/lub antybiotyków, które są obciążone stosunkowo wysokim ryzykiem selekcji oporności bakterii. Leki te powinny być traktowane priorytetowo jako kluczowe cele programów zarządzania i monitorowania (<https://www.who.int/publications/i/item/2021-aware-classification>). Ponadto zgodnie z listą opublikowaną również przez WHO (Chaib i wsp., 2017), bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* (w tym *E. coli*) odporne na III generację cefalosporyn znajdują się w pierwszej grupie tzw. patogenów krytycznych, co potwierdza duże znaczenie tych drobnoustrojów jako potencjalnego zagrożenia zdrowia publicznego. Wyniki uzyskane w pracy nr 3 potwierdziły zdolność do produkcji enzymów o poszerzonym spektrum substratowym u wszystkich szczepów uzyskanych na podłożu z cefotaksydem. Oporność była uwarunkowana obecnością pojedynczych genów z grupy *bla_{CTX-M-1}* lub *bla_{CTX-M-9}*, bądź współwystępowaniem co najmniej dwóch genów, najczęściej z grupy *bla_{TEM}* i *bla_{CTX-M-1}*. Pomimo, że ponad 28% szczepów wykazało obecność genu *bla_{TEM}*, nie poddawano go procesowi sekwencjonowania ze względu, że jest to jeden z powszechniej występujących genów i posiada znacznie mniejsze znaczenie epidemiologiczne w porównaniu do pozostałych genów odpowiedzialnych za oporność na cefalosporyny. Ponadto gen ten zawsze współwystępował z jednym z genów z grupy *bla_{CTX-M}*.

Wśród szpitalnych szczepów *E. coli* i *Klebsiella* spp., czyli najważniejszych pod względem klinicznym producentów enzymów o poszerzonym spektrum substratowym, dominowało początkowo występowanie typów TEM i SHV (Lewis i wsp., 2007). Jednakże zjawisko to ewoluowało i głównym zagrożeniem w ostatnich latach stały się szczepy produkujące enzymy typu CTX-M. Jednak, podobnie jak w naszym badaniu, nadal wariant *bla_{SHV-12}* jest wykrywany w szczepach pochodzących od wolno żyjących zwierząt (Darwich i wsp., 2019; Wang i wsp., 2017), w tym również u lisów rudych (Radhouani i wsp., 2013). Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż obecność pierwotnie dominujących typów β -laktamaz u wolno żyjących zwierząt jest

efektem znacznie wolniejszego procesu pozyskiwania nowych wariantów genów pojawiających się w szczepach izolowanych od ludzi i zwierząt poddawanych leczeniu antybiotykami. Z drugiej jednak strony u większości badanych izolatów geny *bla*_{TEM} lub *bla*_{SHV} występowały z genami *bla*_{CTX-M}, co może jednak wskazywać na ewoluującą zmienność profilu oporności na cefalosporyny również w tej grupie zwierząt.

Jedynym wariantem genu z grupy CTX-M-1 był *bla*_{CTX-M-1}, który jednocześnie jest najczęściej wykrywanym genem wśród szczepów *E. coli* pochodzących od wolno żyjących zwierząt, zarówno ptaków, jak i ssaków (Guenther i wsp., 2011; Guenther i wsp., 2012; Poeta i wsp., 2009; Wang i wsp., 2017). Wariant ten jest również najczęściej obserwowanym wariantem genów *bla*_{CTX-M} w szczepach pochodzących od zwierząt gospodarskich i zwierząt domowych (Cormier i wsp., 2019).

Natomiast inne warianty *bla*_{CTX-M} należące do grupy CTX-M-9 wykazane w moich badaniach (*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-65}) były wykrywane w szczepach *E. coli* izolowanych od drobiu, świń, bydła, psów (Cormier i wsp., 2019; Park i wsp., 2019) oraz człowieka (Bevan i wsp., 2017; Ghosh i wsp., 2017). W publikacji nr 2 również wykazałam jeden z tych wariantów (*bla*_{CTX-M-27}) w jedynym wykazanym szczepie o fenotypie ESBL w tej grupie zwierząt, izolowanym od wiewiórki. Jest to wariant genu *bla*_{CTX-M-14} (różnica sekwencji w jednym nukleotydzie), również wykazanym u dwóch szczepów izolowanych od lisa rudego.

W publikacji nr 1, u szczepów izolowanych od kuny i norki wykazałam natomiast ten sam wariant (*bla*_{CTX-M-15}), który w ostatnich latach stał się dominujący wśród inwazyjnych szczepów *E. coli* izolowanych od człowieka i zwierząt gospodarskich w Polsce i na świecie (Bevan i wsp., 2017; Cormier i wsp., 2019; Hong i wsp., 2019; Isgren i wsp., 2019).

Prawie wszystkie izolaty wytwarzające cefalosporynazę typu AmpC były nosicielami genów *bla*_{CMY-2} i tylko jeden szczep pochodzący od lisa rudego miał gen *bla*_{DHA-1} i jednocześnie *bla*_{SHV-12} i *bla*_{CTX-M-1}, będąc nosicielem genów odpowiedzialnych za wytwarzanie cefalosporynaz (AmpC) i enzymów o poszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Pomimo, że takie zróżnicowane konfiguracje enzymów mogą występować u szczepów *E. coli* izolowanych od innych gospodarzy (Hong i wsp., 2019), obecność genów *bla*_{DHA} u tego gatunku bakterii jest rzadkie. Większe znaczenie kliniczne w medycynie i weterynarii przypisuje się *bla*_{DHA}-dodatnim szczepom *K. pneumoniae* (Ribeiro i wsp., 2020; Donati i wsp., 2014).

Gen *bla*_{CMY-2} stanowi dominujący mechanizm wśród izolatów wytwarzających cefalosporynazę AmpC, a jego obecność na plazmidach jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za szybkie rozprzestrzenianie się oporności na cefalosporyny (Koga i wsp., 2019). W ostatnich latach notowany jest wzrost wykrywalności *E. coli* wytwarzających CMY-2-cefalosporynazę u zwierząt gospodarskich w krajach europejskich. W izolatach pochodzących od drobiu ponad 30% izolatów opornych na cefalosporyny wykazuje obecność genu *bla*_{CMY-2} (Castellanos i wsp., 2017; Briñas i wsp., 2003). W przypadku wolno żyjących zwierząt obecność *bla*_{CMY-2} jest znacznie rzadziej wykrywana w porównaniu do genów odpowiedzialnych za ESBL (Wang i wsp., 2017). Izolaty wytwarzające cefalosporynazę AmpC wykazywano głównie u gatunków dzikich ptaków (Atterby i wsp., 2016; Jamborova i wsp., 2018; Darwich i wsp., 2019), rzadziej od ssaków, ale *bla*_{CMY-2} był również wykazywany w izolatach *E. coli* pochodzących od jeży, wilków, dzików czy również lisów rudych (Darwich i wsp., 2019; Alonso i wsp., 2016; Turchi i wsp., 2019; Wasyl i wsp., 2018). W moich badaniach wykazałam również obecność tego genu w szczepie *E. coli* izolowanym od ślimaka winniczka, co oznacza, że również bezkręgowce mogą być włączone w zjawisko rozprzestrzeniania się oporności jako wektor pomiędzy kręgowcami a środowiskiem naturalnym.

Wysoki odsetek występowania szczepów wielolekoopornych i opornych na cefalosporyny III generacji u zwierząt wszystkożernych i mięsożernych, odnotowany w moich pracach wskazuje, że gatunki wolno żyjących zwierząt bez względu na rodzaj diety czy zajmowaną niszę środowiskową są potwierdzonym ostatecznym ogniwem kumulującym w wysokim stopniu nie tylko odporne szczepy, ale również geny oporności, które są takie same jak te, które występują w szczepach izolowanych od człowieka czy zwierząt poddawanych terapii antybiotykowej. Zgodnie z definicją wirulencja to względna zdolność patogenu do przewyciężenia mechanizmów obronnych gospodarza i wywołania choroby. Jednym z miarodajnych wskaźników wirulencji danego drobnoustroju jest posiadanie przez niego czynników wirulencji związanych z adherencją, inwazją czy wytwarzaniem różnego rodzaju toksyn i enzymów uszkodzających tkanki gospodarza. W moich badaniach nie oceniłam możliwości ekspresji i faktycznej zdolności do wytwarzania określonych czynników, jedynie wykazałam występowanie genów kodujących poszczególne czynniki co nie jest tożsame z możliwością ich wytwarzania. Dlatego stwierdzenie obecności genów może być jedynie pośrednim wskaźnikiem zdolności badanych szczepów do wywoływania choroby u ludzi i zwierząt.

W publikacji 2 i 3 przebadano występowanie wybranych genów związanych z wirulencją szczepów *E. coli*, na podstawie których izolaty zostały zaklasyfikowane do jednego z czterech wybranych patotypów: enterotoksycznych (ETEC), enteropatogennych (EPEC), enterokrwotocznych (EHEC) lub pozajelitowych patogennych szczepów *E. coli* (ExPEC). Pomimo szerokiej analizy występowania wielu genów wirulencji ich obecność zidentyfikowano tylko u dziewięciu szczepów. Dominowała obecność pozajelitowych patogennych szczepów *E. coli* (n=5). Odnotowano także obecność szczepów o patotypie ETEC i EHEC. Nie zidentyfikowano żadnych genów wirulencji charakterystycznych dla patotypu EPEC.

Pozajelitowe szczepy *E. coli* zostały zidentyfikowane w próbach pochodzących od wiewiórek, szczura, jeża i lisa. Przynależność do patotypu ExPEC została potwierdzona najczęściej przez obecność genów wirulencji związanych z adhezją (fimbrie P, S, F1C), obecnością receptora zaangażowanego w transport żelaza oraz syntezy polisacharydów otoczkowych o działaniu antyfagocytarnym. Szczepy o patotypie ExPEC są szeroko rozpowszechnione i dość często izolowane są od zdrowych nosicieli (np. odnotowano je również w ostatnich badaniach dotyczących zwierząt gospodarskich, zwierząt towarzyszących i człowieka) (Zou i wsp., 2021; Kocúreková i wsp., 2021; Sarowska i wsp., 2019; Wieler i wsp., 2011; Ewers i wsp., 2021; Johnson i wsp., 2009), ale jednocześnie ze względu na ich szerokie oddziaływanie również izolowano je z przypadków klinicznych (Singer, 2015).

W przeprowadzonych badaniach wykryłam również geny wirulencji klasyfikujące szczepy do patotypu enterotoksycznych *E. coli*. Szczepy ETEC izolowane są często z próbek pochodzących od zwierząt gospodarskich i są odpowiedzialne za wywoływanie biegunki przede wszystkim u młodych zwierząt. Występują często u świń i bydła (Dubreuil, 2012; Fairbrother i Nadeau, 2006; Nagy i Fekete, 2005). Najnowsze badania wskazują na występowanie szczepów ETEC *E. coli* o potencjalnym zagrożeniu dla człowieka w Chinach (Yang i wsp., 2021). Patotyp ETEC rzadko jest izolowany od zwierząt wolno żyjących ze względu na brak danych o etiologii biegunki występującej u tej grupy zwierząt (Milton i wsp., 2019).

Moje badania ujawniły również występowanie szczepów EHEC u zwierząt wolno żyjących. Szczepy *E. coli* wytwarzające toksyny Shiga są często izolowane zarówno od zwierząt hodowlanych, jak i wolno żyjących oraz od ludzi. Najczęściej szczepy o patotypie EHEC

występują u bydła (Milton i wsp., 2019; Tavakoli i Pourtaghi, 2017). W przypadku gatunków wolno żyjących izolowano je od różnych gatunków ptaków (Sanches i wsp., 2017), dzików (Bertelloni i wsp., 2020) oraz zwierząt kopytnych (Turchi i wsp., 2019). Nie wiadomo jakie znaczenie dla statusu zdrowotnego ma obecność określonych patotypów. Ze względu na brak możliwości obserwacji klinicznej czy możliwości leczenia, a także diagnostyki przyżyciowej zwierząt wolno żyjących trudno ocenić czy patogenne szczepy *E. coli* stanowią istotny udział jako przyczyna chorób infekcyjnych u tej grupy zwierząt. Niemniej podobnie jak w przypadku oporności, zwierzęta wolno żyjące również mogą stanowić rezerwuar szczepów patogennych dla człowieka i innych gatunków zwierząt. Obecność genów wirulencji u zaledwie 8% lekoopornych izolatów pozwala stwierdzić, że te dwa zjawiska raczej nie są ze sobą skorelowane.

Wśród szczepów cefalosporyno-opornych ze względu na ich znaczenie epidemiologiczne, przeprowadzona została analiza MLST w celu określenia zróżnicowania klonalnego uzyskanych izolatów *E. coli*. Metoda MLST pozwoliła uzyskać aż 28 różnych typów sekwencyjnych (żaden ze stwierdzonych typów nie okazał się nowy), natomiast konstrukcja drzewa UPGMA ujawniła zależności występujące pomiędzy szczepami. Najbardziej zróżnicowaną grupą pod względem występowania typów sekwencyjnych były szczepy uzyskane od lisa rudego. Pomimo, iż materiał badawczy pochodził głównie z jednego regionu geograficznego wśród tych izolatów wyodrębniono aż 25 typów sekwencyjnych i znaleziono pewne prawidłowości. Analizując drzewo UPGMA zauważyć można, że pięć szczepów o typie sekwencyjnym 2178 wykazuje obecność genów z grupy *bla_{CTX-M}* warunkujących oporność na poszerzone spektrum substratowe. Były to jedyne geny wykazane u tych szczepów, a wszystkie te szczepy nie zostały zaklasyfikowane jako wielolekooporne (oporność na cefalosporyny, ampicylinę i w jednym przypadku również na chloramfenikol). Typ sekwencyjny 2178 zidentyfikowano już wcześniej w wodzie pitnej, jednak nie został wykryty u szczepów pochodzenia zwierzęcego ani ludzkiego (Blyton i Gordon, 2017).

Sześć szczepów wyizolowanych od lisa rudego zostało zaklasyfikowanych do kompleksu klonalnego 10 o czterech różnych typach sekwencyjnych: 10, 10980, 746 i 744. Wszystkie te izolaty różniły się między sobą pod względem występowania genetycznych determinant oporności. Dwa typy sekwencyjne 10 nie zostały zaklasyfikowane jako wielolekooporne i wykazywały oporność jedynie na beta-laktamy. Pozostałe izolaty charakteryzował profil wielolekooporny i większość z nich posiadała geny z grupy *bla_{CTX-M}* oraz *sul2*. W literaturze

światowej często spotykanym jest rozprzestrzenienie szczepu o kompleksie klonalnym 10 niosącym jednocześnie geny *bla_{CTX-M-15}*, wykazywanym zarówno u szczepów uzyskanych od zwierząt gospodarskich, wolno żyjących jak i z próbek pochodzących od człowieka (Apostolakos i wsp., 2020; Loncaric i wsp., 2013).

W badaniach zaobserwowano duże zróżnicowanie także pomiędzy szczepami należącymi do tego samego kompleksu klonalnego. Często do jednego kompleksu klonalnego są zaklasyfikowane izolaty o fenotypie wielolekoopornym i odporne tylko na jeden z badanych środków przeciwdrobnoustrojowych (Cplx69, 155), co jasno wskazuje, że w przypadku tak zróżnicowanej puli badawczej szczepy należące nawet do tego samego typu sekwencyjnego mogą się od siebie znacznie różnić pod względem cech przekazywanych na drodze wymiany horyzontalnej.

Nowe badania przeprowadzone w Polsce wykazały obecność typów sekwencyjnych tożsamyh z otrzymanymi w moich badaniach. Skarżyńska i wsp. (2021) analizując oporność szczepów *E. coli* u dzikiego ptactwa w Polsce wykazała obecność typów sekwencyjnych 10 i 9699. Podobnie w badaniach Książczyk i wsp. (2021) w szczepach pochodzących od gadów wykazano obecność typów sekwencyjnych 665 oraz 117. Ćwiek i wsp. (2021) wykazali obecność szczepów *E. coli* o fenotypie wielolekoopornym o następujących typach sekwencyjnych: 117, 10, 744, 156 u brojlerów w Polsce. Również doniesienia z nowej literatury światowej wskazują na rozprzestrzenianie się typów sekwencyjnych 155 i 117 u zwierząt gospodarskich i zwierząt wolno żyjących w Grecji (Athanasakopoulou et al., 2021b), Portugalii i Hiszpanii (Sabença i wsp., 2021).

Trzy szczepy wyizolowane od nerek cechowało znaczne podobieństwo pod względem oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, obecności wybranych determinant oporności jak również wszystkie zostały zaklasyfikowane do typu sekwencyjnego 156. Szczepy różniły się jedynie obecnością lub brakiem genu *sul1* warunkującego oporność na sulfametoksazol. Ten wynik może świadczyć o rozprzestrzenianiu się tego samego klonu pomiędzy zwierzętami należącymi do tego samego gatunku. Obecność podobnych genetycznie szczepów *E. coli* wyizolowanych z dzikich zwierząt odnotowano już w Polsce (Nowakiewicz i wsp., 2020a), niemniej zastosowano do tego celu bardziej precyzyjną metodę (również ADSRRS-fingerprinting), co pozwoliło na jednoznaczne wykazanie podobieństwa. W przypadku metody MLST, która bazuje na analizie polimorfizmu tylko wybranych genów, uzyskane wyniki w

przypadku nerek pozwalają jedynie na przypuszczenie, że mogą to być te same lub bardzo podobne izolaty.

Podsumowując, zaobserwowałam duże zróżnicowanie typów sekwencji wśród testowanych szczepów, ale poza typem sekwencyjnym 2178 nie znalazłam żadnej prawidłowości związanej z rodzajem enzymów (szczepy wytwarzające ESBL i szczepy wytwarzające cefalosporynazy AmpC) i typem ST. W obu grupach znaleziono typy sekwencji ST10 (10Cplx), ST 69 (69Cplx) i ST683 (155 Cplx) i pomimo, że typy sekwencji z kompleksów 101, 23, 446, 156 i 648 wykryto tylko w izolatach posiadających geny kodujące ESBL, może to być zjawisko całkowicie przypadkowe.

6. Wnioski

1. Zwierzęta wolno żyjące są istotnym rezerwuarem wielolekoopornych szczepów *Escherichia coli* w środowisku, niemniej szczepy lekooporne izolowane z tej grupy zwierząt cechuje niski, 8% poziom współwystępowania genów wirulencji.
2. Niestandardowe podejście do etapu izolacji szczepów, wykorzystujące cztery kombinacje podłoża różnicującego suplementowanego antybiotykiem znacznie zwiększa odsetek izolatów lekoopornych z pojedynczej badanej próby, co przekłada się na realne odzwierciedlenie poziomu występowania tych izolatów u zwierząt wolno żyjących.
3. Zastosowanie dwuetapowej analizy porównawczej szczepów z wykorzystaniem oceny fenotypowej oporności oraz porównania profili genomowych izolatów pozwala na skuteczną eliminację szczepów zduplikowanych uzyskanych z pojedynczej badanej próby i skutecznie zapobiega przeszacowaniu wyników.
4. Dieta badanych zwierząt może mieć pewien wpływ na występowanie lekoopornych bakterii *Escherichia coli* w bocie przewodu pokarmowego.
5. Wiodąca oporność na ampicylinę, tetracyklinę i sulfametoksazol występująca u badanych szczepów *Escherichia coli* pochodzących od zwierząt wolno żyjących w Polsce jest tożsama z profilami oporności występującymi u bakterii izolowanych od zwierząt towarzyszących i gospodarskich w Polsce i na świecie; jednocześnie u badanych szczepów wykazano również takie same geny warunkujące oporność, które występują u szczepów izolowanych od zwierząt poddawanych celowanej terapii.
6. Dzięki zastosowanej metodyce możliwe jest uzyskanie kilku odrębnych izolatów *E. coli* od tego samego zwierzęcia, co wyraźnie potwierdza ogromne zróżnicowanie profili oporności szczepów zasiedlających przewód pokarmowy pojedynczych osobników.
7. Obecność genów niosących oporność na poszerzone spektrum substratowe u szczepów *E. coli* koreluje z występowaniem genów PMQR odpowiedzialnych za oporność na fluorochinolony i przenoszonych na drodze wymiany horyzontalnej.
8. Typy sekwencyjne charakteryzujące szczepy *E. coli* pochodzące od zwierząt wolno żyjących są bardzo zróżnicowane, niemniej są tożsame z typami sekwencyjnymi występującymi u człowieka, zwierząt towarzyszących i gospodarskich.

7. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Wildlife carnivorous mammals as a specific mirror of environmental contamination with multidrug-resistant *Escherichia coli* strains in Poland. Marcelina Osińska, Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba, Sebastian Gnat, Dominik Łagowski, Aleksandra Trościańczyk. *Microb Drug Resist* 2020, 26,9, s. 1120-1131, DOI: 10.1089/mdr.2019.0480. Punkty KBN/MNiSW: 70,00. Impact factor: 3,431

(Mój udział w przygotowanie publikacji wynosi 75% i polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu i opracowaniu literatury i przygotowaniu manuskryptu)

2. Wildlife omnivores and herbivores as a significant vehicle of multidrug-resistant and pathogenic *Escherichia coli* strains in environment. Marcelina Osińska, Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba, Sebastian Gnat, Dominik Łagowski. *Environ. Microbiol. Rep.* 2020, 12, 6, s. 712-717, DOI: 10.1111/1758-2229.12886. Punkty MNiE/MNiSW: 100,00. Impact factor: 3,541

(Mój udział w przygotowanie publikacji wynosi 80% i polegał nawspółdziale w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu literatury i opracowaniu oraz korekcie manuskryptu po ocenie recenzentów)

3. A rich mosaic of resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland as a potential effect of increasing synanthropization. Marcelina Osińska; Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba; Sebastian Gnat; Dominik Łagowski; Aleksandra Trościańczyk, *Sci. Total Environ.* 2022, 818, 151834, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151834. Punkty MNiE/MEiN: 200,00. Impact factor: 7.963.

(Mój udział w przygotowanie publikacji wynosi 80% i polegał na: współdziale w opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu analiz badawczych zawartych w części metodycznej pracy, wizualizacji i dokumentacji wyników i bankowaniu szczepów, udziale w analizie i interpretacji wyników, gromadzeniu literatury i przygotowaniu manuskryptu).

8. Piśmiennictwo

- Alonso, C.A., González-Barrio, D., Tenorio, C., Ruiz-Fons, F., Torres, C., 2016. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.02.003>
- Apostolakos, I., Feudi, C., Eichhorn, I., Palmieri, N., Fasolato, L., Schwarz, S., Piccirillo, A., 2020. High-resolution characterisation of ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* isolated from the broiler production pyramid. *Sci. Rep.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68036-9>
- Araújo, B.F., de Campos, P.A., Royer, S., Ferreira, M.L., Gonçalves, I.R., da Fonseca Batistão, D.W., Resende, D.S., De Brito, C.S., Gontijo-Filho, P.P., Marques Ribas, R., 2017. High frequency of the combined presence of QRDR mutations and PMQR determinants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from nosocomial and community-acquired infections. *J. Med. Microbiol.* 66, 1144–1150. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000551>
- Athanasakopoulou, Z., Reinicke, M., Diezel, C., Sofia, M., Chatzopoulos, D.C., Braun, S.D., Reissig, A., Spyrou, V., Monecke, S., Ehricht, R., Tsilipounidaki, K., Giannakopoulos, A., Petinaki, E., Billinis, C., 2021a. Antimicrobial resistance genes in ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from animals in Greece. *Antibiotics* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040389>
- Athanasakopoulou, Z., Tsilipounidaki, K., Sofia, M., Chatzopoulos, D.C., Giannakopoulos, A., Karakousis, I., Giannakis, V., Spyrou, V., Touloudi, A., Satra, M., Galamatis, D., Diamantopoulos, V., Mpellou, S., Petinaki, E., Billinis, C., 2021b. Poultry and wild birds as a reservoir of CMY-2 producing *Escherichia coli*: The first large-scale study in Greece. *Antibiotics* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030235>
- Atterby, C., Ramey, A.M., Hall, G.G., Järhult, J., Börjesson, S., Bonnedahl, J., 2016. Increased prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in gulls sampled in Southcentral Alaska is associated with urban environments. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.3402/IEE.V6.32334>

- Bélanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C.M., 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>
- Bertelloni, F., Cilia, G., Bogi, S., Ebani, V.V., Turini, L., Nuvoloni, R., Cerri, D., Fratini, F., Turchi, B., 2020. Pathotypes and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from wild boar (*Sus scrofa*) in Tuscany. *Animals* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani10040744>
- Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M., 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J., 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.017>
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J.M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Dahbi, G., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J. 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol.* 41, 1351–1356
- Blyton, M.D.J., Gordon, D.M., 2017. Genetic attributes of *E. coli* isolates from chlorinated drinking water. *PLoS One* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169445>
- Bodendoerfer, E., Marchesi, M., Imkamp, F., Courvalin, P., Böttger, E.C., Mancini, S., 2020. Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *Int. J. Antimicrob. Agents* 56, 106019. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106019>
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M., 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753–6761. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005>
- Braz, V.S., Melchior, K., Moreira, C.G., 2020. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic

- and Versatile Bacterium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
- Briñas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Dominguez, L., Torres, C., 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2056–2058. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.2056-2058.2003>
- Castellanos, L.R., Donado-Godoy, P., León, M., Clavijo, V., Arevalo, A., Bernal, J.F., Timmerman, A.J., Mevius, D.J., Wagenaar, J.A., Hordijk, J., 2017. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncI1 plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS One* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170777>
- Chaib, F., Kieny, M.-P., Helen, B., Magrini, N., Deborah, M., Oelrich, C., Tacconelli, E., Gonzalo, V., Dasilva, C.P., Mcneil, D., 2017. Antibiotic-resistant priority pathogens list. *Oms* 11.
- Chapman, T.A., Wu, X.Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wolso,n M., Chin, J.J.C. 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from health and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4782-4795.
- Chrobak-Chmiel, D., Kwiecień, E., Golke, A., Dolka, B., Adamczyk, K., Biegańska, M.J., Spinu, M., Binek, M., Rzewuska, M., 2021. Pigeons as Carriers of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Pathogens—A Clinical Case Report and Literature Review. *Front. Vet. Sci.* 8, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.664226>
- CLSI, 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI Document M100-S25., Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Cormier, A., Zhang, P.L.C., Chalmers, G., Weese, J.S., Deckert, A., Mulvey, M., McAllister, T., Boerlin, P., 2019. Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet. Microbiol.* 231, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031>
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Coelho, A.C., Matos, M., Rojo-Bezares, B., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb. Drug Resist.* 14, 71–77. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0795>
- Ćwiek, K., Woźniak-Biel, A., Karwańska, M., Siedlecka, M., Lammens, C., Rebelo, A.R., Hendriksen, R.S., Kuczkowski, M., Chmielewska-Władyka, M., Wieliczko, A., 2021. Phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian J. Microbiol.* 52, 1597–1609. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00538-8>
- Daniel Dubreuil, J., 2012. The whole shebang: The gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr. Issues Mol. Biol.* 14, 71–82. <https://doi.org/10.21775/cimb.014.071>
- Darwich, L., Vidal, A., Seminati, C., Albamonte, A., Casado, A., López, F., Molina-López, R.A., Migura-García, L., 2019. High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. *PLoS One* 14, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210686>
- Dobiasova, H., Dolejska, M., 2016. Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and β -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2118–2124. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw144>
- Donati, V., Feltrin, F., Hendriksen, R.S., Svendsen, C.A., Cordaro, G., García-Fernández, A., Lorenzetti, S., Lorenzetti, R., Battisti, A., Franco, A., 2014. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090564>
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2020. Antimicrobial Resistance in the

- EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. ECDC, Stockholm.
- European Medicines Agency, 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (EMA/24309/2020).
- European Medicines Agency, 2018. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016- Trends from 2010 to 2016- Eight ESVAC report. Eur. Med. Agency 176. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2011.05.019>
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. EFSA J. 19, 6490. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490> 179 pp.
- Ewers, C., de Jong, A., Prenger-Berninghoff, E., El Garch, F., Leidner, U., Tiwari, S.K., Semmler, T., 2021. Genomic Diversity and Virulence Potential of ESBL- and AmpC- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains From Healthy Food Animals Across Europe. *Front. Microbiol.* 12, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626774>
- Fairbrother, J.M., Nadeau, É., 2006. *Escherichia coli*: On-farm contamination of animals. *OIE Rev. Sci. Tech.* 25, 555–569. <https://doi.org/10.20506/rst.25.2.1682>
- Fang, H., F. Ataker, G. Hedin, and K. Dornbusch. 2008. Molecular epidemiology of Extended spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46:707–712. [doi:10.1128/JCM.01943-07](https://doi.org/10.1128/JCM.01943-07).
- Ghosh, H., Doijad, S., Falgenhauer, L., Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2017. BlaCTX-M-27–Encoding *Escherichia coli* sequence type 131 lineage c1-m27 clone in clinical Isolates, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1754–1756. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170938>
- Giebułtowicz, J., Nałęcz-Jawecki, G., Harnisz, M., Kucharski, D., Korzeniewska, E., Płaza, G., 2020. Environmental risk and risk of resistance selection due to antimicrobials' occurrence in two Polish wastewater treatment plants and receiving surface water. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25061470>
- Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M.,

- Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L.H., Ewers, C., 2012. Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Birds of Prey from Germany and Mongolia. *PLoS One* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053039>
- Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H., 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front. Microbiol.* 2, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>
- Gyles, C., Boerlin, P., 2014. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet. Pathol.* 51, 328–340. <https://doi.org/10.1177/0300985813511131>
- Hendriksen, R.S., Bangtrakulnonth, A., Pulsrikarn, C., Pornreongwong, S., Hasman, H., Song, S.W., and Aarestrup, F.M. 2008. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Salmonella* Rissen from animals, food products, and patients in Thailand and Denmark. *Food-borne Pathog. Dis.* 5, 605–619.
- <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>
- http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search
- Hong, J.S., Song, W., Park, H.M., Oh, J.Y., Chae, J.C., Shin, S., Jeong, S.H., 2019. Clonal spread of extended-spectrum cephalosporin-resistant enterobacteriaceae between companion animals and humans in South Korea. *Front. Microbiol.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01371>
- Hooper, D.C., Jacoby, G.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1354, 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>
- Hu, Y.S., Shin, S., Park, Y.H., Park, K.T., 2017. Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine feces in Korea. *J. Food Prot.* 80, 1145–1151. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-502>
- Isgren, C.M., Edwards, T., Pinchbeck, G.L., Winward, E., Adams, E.R., Norton, P., Timofte, D., Maddox, T.W., Clegg, P.D., Williams, N.J., 2019. Emergence of carriage of CTX-M-15 in faecal *Escherichia coli* in horses at an equine hospital in the UK; Increasing prevalence over a decade (2008-2017). *BMC Vet. Res.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2011-9>

- Jakobsen, L., D. Sandvang, L. H. Hansen, L. Bagger-Skjøt, H. Westh, C. Jørgensen, D. S. Hansen, B. M. Pedersen, D. L. Monnet, N. Frimodt-Møller, S. J. Sørensen, and A. M. Hammerum. 2008. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environ. Int.* 34:108–115 doi:10.1016/j.envint.2007.07.011
- Jamborova, I., Janecko, N., Halova, D., Sedmik, J., Mezerova, K., Papousek, I., Kutilova, I., Dolejska, M., Cizek, A., Literak, I., 2018. Molecular characterization of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase- and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among corvids (*Corvus brachyrhynchos* and *Corvus corax*) roosting in Canada. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy166>
- Jessen, L.R. Damborg, P.P. Spohr, A., Sørensen, T.M., Langhorn, R., Goericke-Pesch, S.K., Houser, G., Willesen, J., Schjærff, M., Eriksen, T., Jensen, W.F., Guardabassi, L., Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice (2nd ed.). The Danish Small Animal Veterinary Association, SvHKS, 2019.
- Johnson, J.R., Miller, S., Johnston, B., Clabots, C., DebRoy, C., 2009. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3721–3725. <https://doi.org/10.1128/JCM.01581-09>
- Jurado-Rabadán, S., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., de Vries, L.E., Agersø, Y., 2014. Detection and linkage to mobile genetic elements of tetracycline resistance gene tet(M) in *Escherichia coli* isolates from pigs. *BMC Vet. Res.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-155>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., Wold, A.E., 2006. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 156–161. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.156-161.2006>
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., Rajashekara, G., 2021. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control

- strategies. *Pathogens* 10, 1–32. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
- Katouli, M., 2010. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran. J. Microbiol.* 2, 59–72.
- Kim, H.B., Park, C.H., Kim, C.J., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. 2009. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 639–645. doi:10.1128/AAC.01051-08
- Kindle, P., Zurfluh, K., Nüesch-Inderbilen, M., Von Ah, S., Sidler, X., Stephan, R., Kümmerlen, D., 2019. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* with non-susceptibility to quinolones isolated from environmental samples on pig farms. *Porc. Heal. Manag.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0116-y>
- Kocúřeková, T., Karahutová, L., Bujňáková, D., 2021. Antimicrobial susceptibility and detection of virulence-associated genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial broilers. *Antibiotics* 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111303>
- Koga, V.L., Maluta, R.P., Da Silveira, W.D., Ribeiro, R.A., Hungria, M., Vespero, E.C., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2019. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiol.* 19, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1550-3>
- Kotlarska, E., Łuczkiwicz, A., Pisowacka, M., Burzyński, A., 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2018–2030. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3474-7>
- Książczyk, M., Dudek, B., Kuczkowski, M., O’Hara, R., Korzekwa, K., Wzorek, A., Korzeniowska-Kowal, A., Upton, M., Junka, A., Wieliczko, A., Ratajszczak, R., Bugla-Płoskońska, G., 2021. The phylogenetic structure of reptile, avian and uropathogenic *Escherichia Coli* with particular reference to extraintestinal pathotypes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22031192>
- Leclercq, A., Lambert, B., Pierard, D., Mahillon, J., 2001. Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1161–1164. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1161-1164.2001>

- Leekitcharoenphon, P., Johansson, M.H.K., Munk, P., Malorny, B., Skarżyńska, M., Wadepohl, K., Moyano, G., Hesp, A., Veldman, K.T., Bossers, A., Graveland, H., van Essen, A., Battisti, A., Caprioli, A., Blaha, T., Hald, T., Daskalov, H., Saatkamp, H.W., Stärk, K.D.C., Luiken, R.E.C., Van Gompel, L., Hansen, R.B., Dewulf, J., Duarte, A.S.R., Zając, M., Wasyl, D., Sanders, P., Gonzalez-Zorn, B., Brouwer, M.S.M., Wagenaar, J.A., Heederik, D.J.J., Mevius, D., Aarestrup, F.M., 2021. Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93970-7>
- Lewis, J.S., Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J.E., Jorgensen, J.H., 2007. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4015–4021. <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-07>
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzyska, H., Bzoma, S., Cizek, A., 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the baltic sea coast of Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8126–8134. <https://doi.org/10.1128/AEM.01446-10>
- Literak, I., M. Dolejska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Friedman, F.M. Aarestrup, H. Hasman, and A. Cizek. 2010. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol.* 108:1702–1711.
- Liu, B.T., Liao, X.P., Yang, S.S., Wang, X.M., Li, L.L., Sun, J., Yang, Y.R., Fang, L.X., Li, L., Zhao, D.H., Liu, Y.H., 2012. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. *J. Med. Microbiol.* 61, 1591–1599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.043307-0>
- Liu, J., Keelan, P., Bennett, P.M., Enne, V.I., 2009. Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef* (B), found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 423–426. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn523>
- Loncaric, I., Stalder, G.L., Mehinagic, K., Rosengarten, R., Hoelzl, F., Knauer, F., Walzer, C.,

2013. Comparison of ESBL - And AmpC producing enterobacteriaceae and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084048>
- Lopes, C.E., De Carli, S., Weber, M.N., Fonseca, A.C.V., Tagliari, N.J., Foresti, L., Cibulski, S.P., Mayer, F.Q., Canal, C.W., Siqueira, F.M., 2020. Insights on the genetic features of endometrial pathogenic *Escherichia coli* strains from pyometra in companion animals: Improving the knowledge about pathogenesis. *Infect. Genet. Evol.* 85, 104453. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104453>
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mare, A.D., Ciurea, C.N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L., Toma, F., 2021. Enteropathogenic *Escherichia coli* - A summary of the literature. *Gastroenterol. Insights* 12, 28–40. <https://doi.org/10.3390/GASTROENT12010004>
- Milton, A.A.P., Agarwal, R.K., Priya, G.B., Aravind, M., Athira, C.K., Rose, L., Saminathan, M., Sharma, A.K., Kumar, A., 2019. Captive wildlife from India as carriers of shiga toxin-producing, enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 321–327. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0488>
- Nagy, B., Fekete, P.Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>
- Nhung, N.T., Cuong, N. V., Campbell, J., Hoa, N.T., Bryant, J.E., Truc, V.N.T., Kiet, B.T., Jombart, T., Trung, N. V., Hien, V.B., Thwaites, G., Baker, S., Carrique-Mas, J., 2015. High levels of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the mekong delta of Vietnam. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 812–820. <https://doi.org/10.1128/AEM.03366-14>
- Nojoomi, F., Vafaei, M., Rajabi Vardanjani, H., 2018. The Relationship Between Class I and

- II Integrons and Antibiotic Resistance Among *Escherichia coli* Isolates From Urinary Tract Infections. *Int. J. Enteric Pathog.* 6, 45–47. <https://doi.org/10.15171/ijep.2018.12>
- Nowaczek, A., Dec, M., Stępień-Pyśniak, D., Urban-Chmiel, R., Marek, A., Róžański, P., 2021. Antibiotic resistance and virulence profiles of *Escherichia coli* strains isolated from wild birds in Poland. *Pathogens* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081059>
- Nowak K., Fahr J., Weber N., Lubke-Becker A., Semmler T., Weiss S., Mombouli J.V., Wieler L.H., Guenther S., Leendertz F.H., Ewers C. 2017. Highly diverse and antimicrobial susceptible *Escherichia coli* display a naive bacterial population in fruit bats from the Republic of Congo. *Plos One* 12, 1-18.
- Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Trościańczyk, A., Osińska, M., Łagowski, D., Kosior-Korzecka, U., Puzio, I., 2020a. Bats as a reservoir of resistant *Escherichia coli*: A methodical view. Can we fully estimate the scale of resistance in the reservoirs of free-living animals? *Res. Vet. Sci.* 128, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.017>
- Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., Trościańczyk, A., Osińska, M., Łagowski, D., Kosior-Korzecka, U., Puzio, I., 2020b. A significant number of multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* in wildlife animals; long-term consequences and new or known reservoirs of resistance? *Sci. Total Environ.* 705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135830>
- Nowakiewicz, A., Zieba, P., Ziółkowska, G., Gnat, S., Muszyńska, M., Tomczuk, K., Dziejdz, B.M., Ulbrych, Ł., Trościańczyk, A., 2016. Free-living species of carnivorous mammals in Poland: Red fox, beech marten, and raccoon as a potential reservoir of *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* spp. and coagulase-positive *Staphylococcus*. *PLoS One* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155533>
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Zięba, P., Dziejdz, B.M., Gnat, S., Wójcik, R., Dziejdz, R., Kostruba, A., 2015. Aerobic bacterial microbiota isolated from the cloaca of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. *J. Wildl. Dis.* 51, 255–259. <https://doi.org/10.7589/2013-07-157>
- Ong, K.H., Khor, W.C., Quek, J.Y., Low, Z.X., Arivalan, S., Humaidi, M., Chua, C., Seow, K.L.G., Guo, S., Tay, M.Y.F., Schlundt, J., Ng, L.C., Aung, K.T., 2020. Occurrence and antimicrobial resistance traits of *Escherichia coli* from wild birds and rodents in Singapore. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155606>

- Park, H., Kim, J., Ryu, S., Jeon, B., 2019. Predominance of bla CTX-M-65 and bla CTX-M-55 in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from raw retail chicken in South Korea. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 17, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.005>
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in *Escherichia coli* Is Widespread. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1169–1172. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169>
- Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 6, 2153–2162. doi: 10.1128/JCM.40.6.2153–2162.2002
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Gonçalves, A., Rodrigues, J., Estepa, V., Torres, C., Igrejas, G., 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J. Basic Microbiol.* 49, 584–588. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900066>
- Poirel, L., Madec, J-Y, Lupo, A., Schink, A-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum* 6(4):ARBA-0026-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Polish Veterinary Inspection, 2019. AnimalHealth-Regulatory Presentations: Rabies-Poland, October 24–25. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/regcom_ahw_20191024_rab_pol.pdf. (Accessed 22 April 2020). CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Półtorak, K., Wiczorek, K., Osek, J., 2016. Patogenne *Escherichia coli* - Mechanizmy chorobotwórczości. *Med. Weter.* 72, 352–357. <https://doi.org/10.21521/mw.5522>
- Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Estepa, V., Sargo, R., Torres, C., Poeta, P., 2013. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal. *Arch. Microbiol.* 195, 141–144. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0853-7>
- Ramirez, M.S., Tolmasky M.E., 2010. Aminoglycoside Modifying Enzymes, Drug Resist

Updat. 13(6): 151–171.

- Ribeiro, T.G., Novais, Â., Machado, E., Peixe, L., 2020. Acquired AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae from healthy humans and animals, food, aquatic and trout aquaculture environments in Portugal. *Pathogens* 9, 2010–2013. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040273>
- Robles-Jimenez, L.E., Aranda-Aguirre, E., Castelan-Ortega, O.A., Shettino-Bermudez, B.S., Ortiz-Salinas, R., Miranda, M., Li, X., Angeles-Hernandez, J.C., Vargas-Bello-pérez, E., Gonzalez-Ronquillo, M., 2022. Worldwide traceability of antibiotic residues from livestock in wastewater and soil: A systematic review. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12010060>
- Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., Pudova, V., Broz, P., Htoutou-Sedlakova, M., Sauer, P., Bardon, J., Cizek, A., Kolar, M., Literak, I., 2017. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02147>
- Ruiz, J., Simon, K., Horcajada, J.P., Velasco, M., Barranco, M., Roig G., Moreno-Martinez, A., Martinez, J.A., Jimenez de Anta, T., Mensa, J., Vila, J., 2002. Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4445-4449. doi: 10.1128/JCM.40.12.4445-4449.2002
- Rzewuska, M., Stefańska, I., Kizerwetter-Źwida, M., Chrobak-Chmiel, D., Szczygielska, P., Leśniak, M., Binek, M., 2015. Characterization of extended-spectrum- β -lactamases produced by *Escherichia coli* strains isolated from dogs in Poland. *Polish J. Microbiol.* 64, 285–288. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0009.2124>
- Sabença, C., Igrejas, G., Poeta, P., Robin, F., Bonnet, R., Beyrouthy, R., 2021. Multidrug Resistance Dissemination in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals: Bacterial Clones and Plasmid Complicity. *Microbiol. Res. (Pavia)*. 12, 123–137. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010009>
- Saenz, Y., L. Brinas, E. Domínguez, J. Ruiz., M. Zarazaga, J. Vila, and C. Torres. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of

- human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Ch.* 48:3996–4001. doi:10.1128/AAC.48.10.3996–4001.2004.
- Sanches, L.A., Gomes, M. da S., Teixeira, R.H.F., Cunha, M.P.V., Oliveira, M.G.X. de, Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., Knobl, T., 2017. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). *Brazilian J. Microbiol.* 48, 760–763. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.003>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I., 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Shin, S.W., Shin, M.K., Jung, M., Belaynehe, K.M., Yoo, H.S., 2015. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5560–5566. <https://doi.org/10.1128/AEM.01511-15>
- Singer, R.S., 2015. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: Evidence and data gaps. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00028>
- Skarżyńska, M., Zając, M., Kamińska, E., Bomba, A., Żmudzki, J., Jabłoński, A., Wasyl, D., 2020. Salmonella and antimicrobial resistance in wild rodents—true or false threat? *Pathogens* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090771>
- Skarżyńska, M., Zając, M., Bomba, A., Bocian, Ł., Kozdruń, W., Polak, M., Wiącek, J., Wasyl, D., 2021. Antimicrobial Resistance Glides in the Sky—Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant *Escherichia coli* With Zoonotic Potential. *Front. Microbiol.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656223>
- Sletteameås, J.S., Sunde, M., Ulstad, C.R., Norström, M., Wester, A.L., Urdahl, A.M., 2019. Occurrence and characterization of quinolone resistant *Escherichia coli* from Norwegian Turkey meat and complete sequence of an IncX1 plasmid encoding qnrS1. *PLoS One* 14,

- 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212936>
- Smith, S., Wang, J., Fanning, S., McMahon, B.J., 2014. Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: A coincidence or cause for concern? *Ir. Vet. J.* 67, 2–4. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-67-8>
- Suojala, L., Kaartinen, L., Pyörälä, S., 2013. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 36, 521–531. <https://doi.org/10.1111/jvp.12057>
- Szmolka, A., Nagy, B., 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258>
- Tavakoli, M., Pourtaghi, H., 2017. Molecular detection of virulence genes and multi-drug resistance patterns in *Escherichia coli* (STEC) in clinical bovine mastitis: Alborz province, Iran. *Iran. J. Vet. Res.* 18, 208–211. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4224>
- Thompson, M.F., Litster, A.L., Platell, J.L., Trott, D.J., 2011. Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. *Vet. J.* 190, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.11.013>
- Touzain, F., Le Devendec, L., de Boisséson, C., Baron, S., Jouy, E., Perrin-Guyomard, A., Blanchard, Y., Kempf, I., 2018. Characterization of plasmids harboring blaCTX-M and blaCMY genes in *E. coli* from French broilers. *PLoS One* 13, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188768>
- Turchi, B., Dec, M., Bertelloni, F., Winiarczyk, S., Gnat, S., Bresciani, F., Viviani, F., Cerri, D., Fratini, F., 2019. Antibiotic susceptibility and virulence factors in *Escherichia coli* from sympatric wildlife of the apuan alps regional park (Tuscany, Italy). *Microb. Drug Resist.* 25, 772–780. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0191>
- Vieira, D.C., Lima, W.G., de Paiva, M.C., 2020. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Mol. Biol. Rep.* 47, 1471–1483. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05220-9>
- Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnolle, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., Renaud, F., 2016.

- REVIEW: Antimicrobial resistance in wildlife. *J. Appl. Ecol.* 53, 519–529.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>
- Wang, J., Ma, Z.B., Zeng, Z.L., Yang, X.W., Huang, Y., Liu, J.H., 2017. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool. Res.* 38, 55–80. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>
- Wasiński, B., 2019. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections. *Ann. Agric. Environ. Med.* 26, 532–537.
<https://doi.org/10.26444/aaem/111724>
- Wasył, D., Zajc, M., Lalak, A., Skaryńska, M., Samcik, I., Kwit, R., Jabłoński, A., Bocian, A., Woaniakowski, G., Hoszowski, A., Szulowski, K., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland. *Microb. Drug Resist.* 24, 807–815. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0148>
- Weiner M, 2011. Shigatoksyczne enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* - nowe czy dobrze znane zagrożenie? *Życie Weter.* 86, 507–514.
- WHO, 2017. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: 5th revision, World Health Organization.
- Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lübke-Becker, A., 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical sampl. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 635–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.009>
- Woodford, N., Fagan, E.J., Ellington, M.J. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob.* 57. 154-155. doi: 10.1093/jac/dki412
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Jensen, L.B., 2010. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet. Scand.* 52, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Yamamoto, S., Iwabuchi, E., Hasegawa, M., Esaki, H., Muramatsu, M., Hirayama, N., Hirai,

K., 2013. Prevalence and molecular epidemiological characterization of antimicrobial-resistant escherichia coli isolates from Japanese black beef cattle. J. Food Prot. 76, 394–404. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-273>

Yang, X., Wu, Y., Liu, Q., Sun, H., Luo, M., Xiong, Y., Matussek, A., Hu, B., Bai, X., 2021. Genomic Characteristics of Stx2e-Producing Escherichia coli Strains Derived from Humans, Animals, and Meats. Pathogens 10, 1551. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121551>

Zou, M., Ma, P.P., Liu, W.S., Liang, X., Li, X.Y., Li, Y.Z., Liu, B.T., 2021. Prevalence and antibiotic resistance characteristics of extraintestinal pathogenic escherichia coli among healthy chickens from farms and live poultry markets in China. Animals 11. <https://doi.org/10.3390/ani11041112>

Marcelina Osińska
28.03.2022