

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI INFECȚIOASE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. Dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
Marinela PASAT (TIPIȘCĂ)**

**IAȘI
2021**

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI INFECȚIOASE**

**INVESTIGAȚII PRIVIND REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE ȘI
RISCU ZONOTIC ASOCIAT TULPINILOR DE *ESCHERICHIA*
COLI IZOLATE DE LA PORC**

**Conducător de doctorat,
Prof. Dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
Marinela PASAT (TIPIȘCĂ)**

**IAȘI
2021**

**“ION IONESCU DE LA BRAD”
IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: INFECTIOUS DISEASES**

DOCTORAL THESIS

**PhD Coordinator,
PhD, Prof. Gheorghe SAVUȚA**

**PhD student,
Marinela PASAT (TIPIȘCĂ)**

**IAȘI
2021**

**“ION IONESCU DE LA BRAD”
IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: INFECTIOUS DISEASES**

**RESEARCHES REGARDING ANTIMICROBIAL RESISTANCE
AND THE ASSOCIATED ZOO NOTIC RISK TO *ESCHERICHIA*
COLI STRAINS ISOLATED FROM SWINE**

**PhD Coordinator,
PhD, Prof. Gheorghe SAVUȚA**

**PhD student,
Marinela PASAT (TIPIȘCĂ)**

**IAȘI
2021**

CUPRINS

INTRODUCERE	9
REZUMAT	17
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	27
CAPITOLUL 1. EPIDEMIOLOGIA ȘI CARACTERISTICILE SPECIEI <i>E. COLI</i>	28
1.1. Încadrare taxonomică și caractere generale	28
1.2. Ecologia și epidemiologia speciei <i>E. coli</i>	29
1.3. Caracterizarea fenomenului de antibioretistență la <i>Enterobacteriaceae</i>	30
1.4. Mecanisme de antibioretistență identificate la <i>E. coli</i>	33
CAPITOLUL 2. FENOMENUL DE ANTIPIOREZISTENȚĂ PRIN MECANISMUL ENZIMELOR BETA-LACTAMAZE CU SPECTRU EXTINS (ESBL) LA <i>E. COLI</i>	35
2.1. Definiția și caracterizarea enzimelor ESBL	35
2.2. Clasificarea moleculară și funcțională a enzimelor ESBL	36
2.3. Transmiterea enzimelor ESBL în populațiile de <i>E. coli</i>	42
2.4. Prevalența și distribuția tulpinilor de <i>E. coli</i> ESBL pozitive identificate în populațiile de porcine	43
2.5. Importanța tulpinilor ESBL izolate de la porci abatorizați în contextul abordării <i>One Health</i>	44
CAPITOLUL 3. IDENTIFICAREA FENOTIPICĂ ȘI CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE <i>E. COLI</i> PRODUCĂTOARE DE ESBL	47
3.1. Identificarea fenotipică a izolatelor de <i>E. coli</i> ESBL pozitive	47
3.2. Modalități de caracterizare a substratului molecular al enzimelor ESBL	48
PARTEA A II-A CERCETĂRI PROPRII	
CAPITOLUL 4. DESCRIEREA CADRULUI ORGANIZATORIC ȘI INSTITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE	51
CAPITOLUL 5. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	52
CAPITOLUL 6. DETECȚIA TULPINILOR DE <i>E. COLI</i> PRODUCĂTOARE DE ESBL IZOLATE DE LA PORCINE ȘI OM	54
6.1. Material și metodă de lucru	54
6.1.1. Recoltarea probelor	54
6.1.2. Detecția tulpinilor de <i>E. coli</i> ESBL/AmpC	55
6.1.3. Confirmarea fenotipică a izolatelor prezumtiv producătoare de enzime ESBL	58
6.1.4. Determinarea paternului de rezistență la alte clase de antibiotice a tulpinilor prezumtiv sintetizatoare ESBL	64
6.2. Rezultate și discuții	64
6.3. Concluzii parțiale	73

CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA SUBSTRATULUI MOLECULAR AL TULPINILOR DE <i>E. COLI</i> ESBL POZITIVE IZOLATE DE LA PORCI ABATORIZAȚI ȘI DE LA PERSONAL DIN FERME	74
7.1. Material și metodă de lucru	74
7.1.1 Identificarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL	75
7.1.2. Identificarea principalelor gene AmpC	78
7.1.3. Identificarea unor markeri genetici asociați cu rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone/Colistin	79
7.1.4. Încadrarea izolatelor de <i>E. coli</i> în principalele grupuri filogenetice	81
7.2. Rezultate și discuții	83
7.2.1 Prevalența tulpinilor <i>E. coli</i> ESBL caracterizate molecular de genele ce codifică enzimele CTX-M, TEM, SHV și OXA	83
7.2.2 Prevalența tulpinilor AmpC pozitive	89
7.2.3 Prevalența tulpinilor purtătoare de gene asociate cu rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone și Colistin	90
7.2.4 Rezultate și discuții privind încadrarea tulpinilor de <i>E. coli</i> în grupuri filogenetice	99
7.3. Concluzii parțiale	103
CAPITOLUL 8. ANALIZA FILOGENETICĂ A GENELOR CE CODIFICĂ ENZIMELE ESBL IDENTIFICATE LA TULPINILE DE <i>E. COLI</i>	105
8.1. Material și metodă de lucru	105
8.2. Rezultate și discuții	105
8.3. Concluzii parțiale	108
CAPITOLUL 9. CONCLUZII FINALE	110
BIBLIOGRAFIE	113
ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR	132
ANEXA 2. LISTA TABELELOR	134
ANEXA 3. LISTA FIGURILOR	138
ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	142

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	9
SUMMARY	17
CONTENT	27
PART I - CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
CHAPTER 1. EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERISTICS OF E. COLI	28
1.1. Taxonomic classification and general characteristics	28
1.2. Ecology and epidemiology of <i>E. coli</i> species	29
1.3. Characterization of the antibiotic resistance phenomenon of <i>Enterobacteriaceae</i>	30
1.4. Antibiotic resistance mechanisms identified in <i>E. coli</i>	33
CHAPTER 2. ANTIBIORESISTANCE PHENOMENON THROUGH THE MECHANISM OF EXPANDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBL)	35
2.1. Definition and characterization of ESBL enzymes	35
2.2. Molecular and functional classification of ESBL enzymes	36
2.3. Transmission of ESBL enzymes in <i>E. coli</i> populations	42
2.4. Prevalence and distribution of ESBL positive <i>E. coli</i> strains identified in pig populations	43
2.5. Importance of ESBL strains isolated from slaughtered pigs in the context of approaching the <i>One Health</i>	44
CHAPTER 3. PHENOTYPICAL IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERISATION OF ESBL PRODUCING E. COLI	47
3.1. Phenotype identification of ESBL positive <i>E. coli</i> isolates	47
3.2. Ways of characterizing the molecular substrate of ESBL enzymes	48
PART II OWN RESEARCH	
CHAPTER 4. DESCRIPTION OF THE ORGANISATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK IN WHICH THE RESEARCH WAS CONDUCTED	51
CHAPTER 5. PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE THESIS	52
CHAPTER 6. DETECTION OF ESBL PRODUCING E. COLI STRAINS ISOLATED FROM PIGS AND HUMANS	54
6.1. Material and working method	54
6.1.1. Sampling	54
6.1.2. Detection of ESBL positive <i>E. coli</i> strains	55
6.1.3. Phenotype confirmation of presumptive ESBL enzyme-producing isolates	58

6.1.4 Determination of resistance pattern to other classes of antibiotics of presumptive ESBL synthesizing strains	64
6.2. Results and discussions	64
6.3. Partial conclusions	74
CHAPTER 7. CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR SUBSTRATE OF POSITIVE E.COLI ESBL STEMS ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIGS AND FARM STAFF	74
7.1. Material and working method	75
7.1.1 Identification of the main genes encoding ESBL enzymes	75
7.1.2. Identification of the main AmpC genes	78
7.1.3. Identification of genetic markers associated with plasmid-mediated resistance to fluoroquinolones /colistin.	79
7.1.4. Classification of <i>E. coli</i> isolates in the main phylogenetic groups	81
7.2. Results and discussions	83
7.2.1 Prevalence of <i>E. coli</i> ESBL strains molecularly characterized by genes encoding CTX-M, TEM, SHV and OXA enzymes	83
7.2.2 Prevalence of AmpC positive strains	89
7.2.3 Prevalence of gene-carrying strains associated with plasmid-mediated resistance to fluoroquinolones and colistin	90
7.2.4 Results and discussions regarding the classification in the phylogenetic groups of <i>E. coli</i> strains	99
7.3. Partial conclusions	103
CHAPTER 8. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF GENES CODING ESBL ENZYMES IDENTIFIED IN <i>E. COLI</i> STEMS	105
8.1. Material and working method	105
8.2. Results and discussions	105
8.3. Partial conclusions	108
CHAPTER 9. FINAL CONCLUSIONS	110
REFERENCES	113
ANNEX 1. LIST OF ABBREVIATIONS	132
ANNEX 2. LIST OF TABLES	134
ANNEX 3. LIST OF FIGURES	138
ANNEX 4. LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS	142

INTRODUCERE

Conceptul modern al chimioterapiei poate fi observat încă de la activitatea lui Paul Ehrlich în sfera descoperirii agenților care prezintă toxicitate selectivă și care pot fi utilizați pentru combaterea bolilor infecțioase. Descoperirea revoluționară a penicilinei de către Fleming, în 1929, ulterior dezvoltată de Chain și Florey, a deschis calea cercetărilor în acest domeniu, mulți alți agenți antimicrobieni fiind dezvoltați și descriși ulterior. Sulfonamidele, produse în Germania în 1935, sunt primii agenți antibacterieni cu spectru larg și cu succes clinic.

Antibioticele sunt utilizate pe scară largă, ca agenți terapeutici sau profilactici, în medicina umană și veterinară, pentru tratarea unor infecțiilor cauzate de bacterii dar, din nefericire, utilizarea necorespunzătoare a acestor substanțe a dus la apariția rapidă a tulpinilor bacteriene rezistente și la erodarea utilității clinice. Apariția **rezistenței la antimicrobiene** (RAM) a fost prezisă de Alexander Fleming, încă din 1945, care avertiza că folosirea abuzivă a penicilinei ar putea duce la selectarea bacteriilor rezistente.

Introducerea de noi antimicrobiene sau modificările aduse claselor mai vechi din ultimele 7 decenii au fost însoțite de apariția noilor mecanisme de rezistență bacteriană. Au fost raportate mecanisme de rezistență la antimicrobiene pentru toate antibioticele cunoscute disponibile în prezent pentru utilizare clinică în medicina umană și veterinară.

Rezistența microorganismelor patogene la antibiotice a devenit o problemă la nivel mondial, cu consecințe grave în tratarea bolilor infecțioase. Folosirea greșită a antibioticelor în medicina umană sau veterinară și în agricultură a avut o principală contribuție la apariția acestui fenomen, conducând în timp la o creșterea alarmantă a numărului de bacterii ce provoacă fie infecții comunitare, fie infecții dobândite în spital (Shaikh ș.a., 2015).

Rezistența este un fenomen natural, făcând parte din selecția pozitivă continuă a clonelor bacteriene rezistente, indiferent dacă acestea sunt bacterii patogene, comensale sau saprofite. RAM modifică structura populației din comunitățile microbiene, conducând la tendințe evolutive accelerate, cu consecințe asupra sănătății umane și animale (Davies, 2010).

Utilizarea antibioticelor în medicina veterinară a condus în timp la o îmbunătățire semnificativă a sănătății și productivității animalelor, la reducerea valorilor indicatorilor de impact asociați unor boli infecțioase bacteriene, însă studiile indică de mult timp faptul că folosirea acestora crește rezistența la medicație nu numai a animalelor, dar și a fermierilor.

Agenții antimicrobieni, utilizați la animalele producătoare de alimente, în Europa, sunt frecvent aceiași sau fac parte din aceleași clase ca și cei utilizați în terapia pacienților umani. Rezistența la antibiotice este principalul efect secundar nedorit al utilizării de antimicrobiene, atât la oameni cât și la animale și rezultă din selecția continuă pozitivă a clonelor bacteriene rezistente, indiferent dacă acestea sunt patogene sau comensale. Acest

lucru va modifica structura populației comunităților microbiene, ceea ce va conduce la tendințe evolutive accelerate, cu consecințe imprevizibile asupra sănătății omului și animalelor. Rezistența bacteriană la antibiotice se poate răspândi de la animalele producătoare de alimente și la oameni, atât pe calea alimentară cât și pe alte căi, precum apa sau alte contaminări de mediu.

Laboratoarele veterinare pentru diagnostic microbiologic se confruntă cu provocări unice în ceea ce privește dificultatea de cultivare a microorganismelor fastidioase implicate în patologia animalelor, selecția de substanțe antimicrobiene în baza testării susceptibilității și evaluarea timpilor de eliminare în scopul asigurării siguranței alimentare. Rezistența la antibiotice constituie un real pericol pentru sănătatea publică mondială, utilizarea judicioasă a antibioticelor fiind impetuos necesară. Conceptul "One Health"- „O singură sănătate” implică colaborarea activă între cele două sectoare medicale, veterinar și uman, pentru o înțelegere eficientă a relației dintre oameni, animale și mediul lor și implicațiile asupra sănătății.

Utilizarea necorespunzătoare a antibioticelor, nu numai în medicina umană, ci și în sfera veterinară și zootehnică, a fost considerată un factor principal care conduce la creșterea fenomenului de RAM (Collignon ș.a., 2013; Chantziaras ș.a., 2014). În consecință, în Europa, Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor (EFSA) și Agenția Europeană pentru Medicamente (AEM) au prezentat măsuri de reducere a utilizării agenților antimicrobieni în creșterea animalelor. (Murphy ș.a., 2017).

Cele mai importante elemente de ordin genetic care asigură transferul genelor de rezistență de la o bacterie (donatoare) la o alta (receptoare), prin mecanisme de conjugare, transformare, transducție și respectiv transpoziție, sunt **plasmidele** și **transpozoni**. Prin intermediul acestor secvențe ale ADN-ului se realizează, în mod frecvent, transmiterea orizontală între diferite specii bacteriene a mai multor markeri ai RAM, aspect ce explică apariția populațiilor bacteriene multirezistente.

În contrast, rezistența rezultată în urma achiziției de gene este identificată cu întârziere, după luni sau chiar ani și este responsabilă în marea majoritate a situațiilor în care bacteriile își elaborează mecanisme de rezistență. Două mecanisme genetice majore sunt implicate în dobândirea RAM: un prim mecanism, prin mutațiile care afectează genele existente (din plasmide sau cromozomi) și un al doilea mecanism, prin achiziția unei gene *de novo*, responsabilă de rezistență.

Creșterea alarmantă a emergenței infecțiilor datorate bacteriilor care produc enzime **beta-lactamaze cu spectru extins** (*Extended Spectrum Beta Lactamase*- ESBL), a dus la apariția suspiciunii că animalele ar putea reprezenta un rezervor de răspândire a genelor de rezistență. Majoritatea cercetărilor internaționale sunt axate pe stabilirea legăturii dintre enzimele ESBL de origine umană și cele de origine animală (Cozma, 2017).

În România, studiile au fost axate în principal pe tulpini de *E. coli* sintetizatoare de ESBL de origine umană iar pentru tulpinile de origine animală studiile au fost efectuate pe tulpini izolate de la pui (Măciucă, 2014; Măciucă ș.a., 2015; Romașcu ș.a., 2018), porc

(Milița ș.a., 2017, Bergșpica ș.a. 2020) și din fecale de la câini și proprietarii acestora (Cozma, 2017).

Din anul 2015, în conformitate cu Decizia 652 CE/2013, în România este în desfășurare un program de control pentru monitorizarea și raportarea rezistenței la antimicrobiene a tulpinilor comensale și zoonotice izolate din probe de conținut cecal de la suinele abatorizate.

În ultimul deceniu, antibioticele utilizate pentru tratarea infecțiilor bacteriene în medicina umană și veterinară sunt cele din clasa beta-lactamine. Apariția tulpinilor de *Enterobacteriaceae* sintetizatoare de ESBL constituie în prezent o amenințare gravă pentru sectorul economic, pentru că acestea hidrolizează și inactivează aceste antibiotice beta-lactamice, diminuând eficacitatea utilizării antibioticelor în terapia infecțiilor pe care le produc și conduc la diferite tipuri de mecanisme de rezistență.

Unele antibiotice au pierdut din eficacitatea de a trata multe infecții cu *Escherichia coli* (*E. coli*), numeroase dintre acestea fiind cele cauzate de tulpini producătoare de enzime ESBL, care sunt rezistente la mai multe antibiotice beta-lactamice, inclusiv penicilinele și cefalosporinele și care sunt acum răspândite atât la animale cât și la oameni, existând potențialul de transfer al microorganismelor sau al materialului genetic care codifică rezistența.

Apariția rezistenței tulpinilor de *E. coli* producătoare de enzime ESBL la antimicrobiene este posibil să depindă de mai mulți factori, cum ar fi presiunea selectivă exercitată prin utilizarea de antimicrobiene la populațiile de animale producătoare de alimente, co-selecția bacteriilor cu rezistență multiplă clonală, răspândirea bacteriilor rezistente și diseminarea elementelor genetice, cum ar fi plasmidele, între bacterii (EFSA Journal, 2018). Lanțul alimentară ar putea reprezenta o sursă substanțială pentru transmiterea genelor ESBL sau a tulpinilor producătoare ESBL de la animalele de rentă la om. (Kola ș.a., 2012; Dohmen ș.a., 2015).

Tema acestei lucrări este de mare actualitate, cu importanță majoră în **stabilirea frecvenței portajului *Enterobacteriaceaelor* producătoare de ESBL în efectivele de suine** în zona de Nord-Est a României precum și a rolului suinelor în transmiterea acestora la om, având în vedere contactul personalului din ferme dar și luând în considerare riscurile privind contaminarea carcaselor de porci, de-a lungul traseului parcurs de acestea până la consumator.

Considerăm că o astfel de cercetare este necesară în România și va oferi date importante din punct de vedere epidemiologic, fiind **încadrată în trendul cercetărilor internaționale unde este cunoscută prezența *Enterobacteriaceaelor* sintetizatoare de ESBL în efectivele de suine și rolul de rezervor al acestei specii pentru om.**

INTRODUCTION

The modern concept of chemotherapy can be observed since the work of Paul Ehrlich in the field of discovery of agents that have selective toxicity and can be used to combat infectious diseases. Fleming's revolutionary discovery of penicillin in 1929, later developed by Chain and Florey, paved the way for research in this area, with many other antimicrobial agents being developed and described later. Sulphonamides, produced in Germany in 1935, are the first broad-spectrum and clinically successful antibacterial agents.

Antibiotics are widely used, as therapeutic or prophylactic agents, in human and veterinary medicine to treat infections caused by bacteria, but unfortunately, the improper use of these substances has led to the rapid emergence of resistant bacterial strains and erosion of clinical utility. The emergence of antimicrobial resistance (AMR) has been predicted by Alexander Fleming since 1945, who warned that the misuse of penicillin could lead to the selection of resistant bacteria.

The introduction of new antimicrobials or changes to older classes in the last 7 decades have been accompanied by the emergence of new bacterial resistance mechanisms. Antimicrobial resistance mechanisms have been reported for all known antibiotics currently available for clinical use in human and veterinary medicine (Boerlin, White, 2013).

Resistance of pathogenic micro-organisms to antibiotics has become a global problem, with serious consequences in the treatment of infectious diseases. The misuse of antibiotics in human or veterinary medicine and in agriculture has had a major contribution to the occurrence of this phenomenon, leading over the time to an alarming increase in the number of bacteria that cause either community infections or hospital-acquired infections (Shaikh, 2015).

Resistance is a natural phenomenon, part of the continuous positive selection of resistant bacterial clones, whether they are pathogenic, commensal or even environmental bacteria.

AMR changes the structure of the population in microbial communities, leading to accelerated evolutionary trends, with consequences for human and animal health (Davies, 2010).

The use of antibiotics in veterinary medicine has over time significantly improved the health and productivity of animals, reduced the values of impact indicators associated with bacterial infectious diseases, but studies have long shown that their use increases the resistance to medication not only of animals, but also of farmers.

The antimicrobial agents used in food-producing animals in Europe are often the same or belong to the same classes as those used in the therapy of human patients. Anti-

microbial resistance is the main unwanted side effect of antimicrobial use in both humans and animals and results from the continuous positive selection of resistant bacterial clones, whether pathogenic or commensal. This will change the population structure of microbial communities, leading to accelerated evolutionary trends, with unpredictable consequences for human and animal health. Bacterial resistance to antimicrobials from food-producing animals can spread to humans both through food and other routes, such as water, or other environmental contamination.

Veterinary laboratories for microbiological diagnosis face unique challenges in terms of the difficulty of culturing micro-organisms involved in animal pathology, the selection of antimicrobial substances based on susceptibility testing and assessment of elimination times in order to ensure food safety. Antibiotic resistance is a real danger to world public health, with the judicious use of antibiotics being necessary. The concept of "One health" - involves active collaboration between the two medical sectors, veterinary and human, to effectively understand the relationship between humans, animals and their environment and health implications.

Improper use of antibiotics, not only in human medicine but also in the veterinary and zootechnical field, was considered a major factor leading to the increase of the phenomenon of AMR (Collignon 2013; Chantziaras 2014). Consequently, in Europe, the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Medicines Agency (EMA) have presented measures to reduce the use of antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union (Murphy et al., 2017).

The most important genetic elements that ensure the transfer of resistance genes from one bacterium (donor) to another (recipient), through mechanisms of conjugation, transformation, transduction and transposition, respectively, are plasmids and transposons. Through these DNA sequences, the horizontal transmission between different bacterial species of several markers of AMR is frequently performed, an aspect that explains the appearance of multi drug-resistant bacterial populations.

In contrast, the resistance resulting from the acquisition of genes is identified late, after months or even years, and is responsible in the vast majority of situations in which bacteria develop resistance mechanisms. Two major genetic mechanisms are involved in acquiring AMR: a first mechanism, through mutations that affect existing genes (from plasmids or chromosomes) and a second mechanism, through the acquisition of a "de novo" gene, responsible for resistance.

The alarming increase in the emergence of infections due to bacteria that produce Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) enzymes has led to suspicions that the animals may be a reservoir for the spread of resistance genes. Most international research is focused on establishing the link between ESBL enzymes of human origin and those of animal origin (Cozma, 2017).

In Romania, the studies were mainly focused on strains of *E. coli* synthesizing ESBL of human origin, and for strains of animal origin the studies were performed only on strains isolated from chickens (Măciucă, 2014; Măciucă and others, 2015) and from faeces from dogs and their owners (Cozma, 2017).

Since 2015, in accordance with Decision 652CE / 2013, a control program is under way in Romania for monitoring and reporting antimicrobial resistance of commensal and zoonotic strains isolated from samples of caecal content from slaughtered pigs.

In the last decade, the antibiotics used to treat bacterial infections in human and veterinary medicine are in the beta-lactam class. The emergence of ESBL - synthesizing Enterobacteriaceae strains is currently a serious threat to the economic sector, as they hydrolyse and inactivate these beta-lactam antibiotics, diminishing the effectiveness of using antibiotics in the treatment of infections they cause and lead to various types of resistance mechanisms.

Some antibiotics have lost their effectiveness in treating many *Escherichia coli* (*E. coli*) infections, many of which are caused by strains producing ESBL enzymes, which are resistant to several beta-lactam antibiotics, including penicillins and cephalosporins, and which are now widespread in both animals and humans, with the potential for transfer of micro-organisms or genetic material encoding resistance.

The emergence of antimicrobial resistance of ESBL-producing strains of *E. coli* enzymes may depend on several factors, such as the selective pressure exerted by the use of antimicrobials in food-producing animal populations, the co-selection of bacteria with multiple clonal resistance, the spread of resistant bacteria and the spread of genetic elements, such as plasmids, between bacteria (EFSA Journal, 2018). The food chain could be a substantial source for the transmission of ESBL genes or ESBL - producing strains from farmed animals to humans. (Kola, 2012; Dohmen, 2015).

The topic of this paper is very topical, with major importance in determining the frequency of ESBL-producing Enterobacteriaceae in pigs in north eastern Romania, as well as the role of pigs in their transmission to humans, given the contact of farm staff but also taking into account the risks of contamination of pig carcasses along the route taken by them to the consumer.

We consider that such research is necessary in Romania and will provide important data from an epidemiological point of view, being part of the trend of international research where the presence of ESBL synthesizing Enterobacteriaceae in swine herds and the reservoir role of this species for humans is known.

MULȚUMIRI

Doresc să adresez alese mulțumiri și recunoștință d-lui Prof. univ. dr. Gheorghe Savuța, conducătorul de doctorat, pentru îndrumarea și sprijinul oferit pe întreaga durată a studiilor doctorale și în realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumiri distinșilor membri ai comisiei de doctorat, cărora le adresez întreaga mea gratitudine, pentru efortul depus în analizarea tezei cu autoritate științifică recunoscută pe plan național și internațional.

Adresez sincere mulțumiri, respect și recunoștință, membrilor comisiei de îndrumare, pentru încrederea, înțelegerea, transparența, răbdarea, suportul profesional și moral oferit pe parcursul anilor și pentru efortul depus în analizarea tezei.

Totodată, mulțumesc atât conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, cât și Facultății de Medicină Veterinară pentru condițiile oferite desfășurării studiilor doctorale.

Mulțumesc în mod special D-nelor Dr. Andreea Paula Cozma, Dr. Adriana Aniță, Dr. Ioana Rățoi pentru permanenta disponibilitate, competență, suport științific și logistic și pentru tot ce mi-au facilitat necondiționat pe toată perioada studiilor doctorale.

Adresez mulțumiri și recunoștință conducerii Direcției Sanitar Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor, d-lui Director Gabriel Ciobanu și d-nei Dr. Elena Ișan, pentru sprijinul tehnologic și suportul oferit desfășurării activităților de cercetare.

Mulțumiri, respect și recunoștință persoanei cheie a cărei contribuție a fost esențială pentru investigațiile realizate pe subiectul propus, d-na. Dr. Emilia Popa.

Mulțumesc colegelor din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor Iași, pentru sprijinul, suportul moral, ajutorul, prietenia și încrederea oferită în desfășurarea activității.

Nu în ultimul rând, îmi manifest cu drag recunoștința și doresc să mulțumesc familiei mele, pentru efortul și susținerea continuă pe parcursul acestor ani.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to extend my thanks and gratitude to Mr. Prof. dr. Gheorghe Savuța, scientific coordinator, for the guidance and support offered throughout the doctoral studies and in the realization of this doctoral thesis.

Thanks to the distinguished members of the doctoral committee, to whom I express my full gratitude, for the effort made in analyzing the thesis, with nationally and internationally recognized scientific authority.

I extend my sincere thanks, respect and gratitude to the members of the steering committee, for the trust, understanding, transparency, patience, professional and moral support provided over the years and for the effort made in analyzing the thesis.

At the same time, I thank both the management of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" Iasi, and of the Faculty of Veterinary Medicine for the conditions offered for conducting doctoral studies.

I would like to thank and gratitude to management of the Sanitary Veterinary and Food Safety Directorate, Mr. Director Gabriel Ciobanu and Dr. Elena Ișan, for the technological assistance and support offered to the research activities.

Special thanks to Dr. Andreea Paula Cozma, Dr. Adriana Anița, Dr. Ioana Rățoi for their permanent availability, competence, scientific and logistical support and for everything they provided me unconditionally throughout my doctoral studies.

Thanks, respect and gratitude to the key person whose contribution was essential for the investigation carried out on the proposed topic, Ms. Dr. Emilia Popa.

I thank my colleagues from the Veterinary Sanitary Laboratory and for Food Safety Iași, for moral support, help, friendship and trust offered in carrying out the activity.

Last but not least, I would like to express my gratitude and thank my family for their continuous effort and support offered over the years.

REZUMAT

Utilizarea substanțelor medicamentoase, atât în scop profilactic, curativ, dar și pentru creșterea randamentului productivității, conduce la îmbunătățirea sănătății animalelor, la reducerea valorilor indicatorilor de impact asociați bolilor infecțioase bacteriene dar favorizează dezvoltarea și răspândirea rezistenței la antibiotice.

Una dintre consecințele administrării necontrolate a antibioticelor constă în modificarea populațiilor bacteriene prin selecția continuă a clonelor bacteriene rezistente, indiferent dacă sunt patogene sau comensale.

Creșterea rezistenței bacteriilor zoonotice la antibiotice a devenit o problemă importantă de sănătate publică la nivel global. Riscul ineficienței tratamentului face ca bacteriile zoonotice rezistente la antimicrobiene să constituie în prezent un subiect de real interes atât în medicina umană, cât și în cea veterinară. Abordarea holistică a conceptului „One Health” include evaluarea posibilelor legături dintre animale, oameni și mediu. Transmiterea bacteriilor rezistente la oamenii care trăiesc în fermă sau în vecinătatea acestora, precum și transmiterea la consumatorii produselor de origine animală, este dovedită științific prin identificarea genelor de rezistență la tulpini izolate atât de la oameni cât și la animale.

Printre procesele de adaptare continuă a bacteriilor se numără și creșterea rezistenței la antimicrobiene, ca urmare a administrării, în unele cazuri excesiv, a acestor medicamente. Apariția *Enterobacteriaceaelor* producătoare de ESBL în microflora fecală a animalelor de fermă reprezintă un risc evident de contaminare a produselor alimentare, ce pot fi vectori majori pentru transportul ESBL în populația umană.

Depistarea și caracterizarea continuă a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL este necesară, sub aspectul impactului porcinelor sănătoase, ca posibil rezervor de *Enterobacteriaceae*, asupra lanțului alimentar. În prezent, la *Enterobacteriaceae*, unul dintre cele mai importante mecanisme de rezistență, care reduce chiar și eficacitatea cefalosporinelor moderne cu spectru extins, se bazează pe producerea de enzime, mediată de plasmide, care inactivează acești compuși prin hidrolizarea inelului lor beta-lactamic.

Prezentul studiu demonstrează o frecvență crescută a tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare ESBL în fermele de porcine cu consum ridicat de cefalosporine din a treia sau a patra generație și indică transferul mediat plasmidic, între porci și fermieri.

Confirmarea transferului interspecific se poate face pe baza identificării genei CTX-M-1 la izolatele de la animale și om.

Teza de doctorat cu titlul **„Investigații privind rezistența la antibiotice și riscul zoonotic asociat tulpinilor de *Escherichia coli* izolate de la porc”** este structurată, conform uzanțelor, în două părți și cuprinde un număr de 142 pagini.

Prima parte, care conține **„Stadiul actual al cunoașterii”**, cuprinde 22 de pagini, fiind structurată în trei capitole. Pe parcursul acestei părți sunt prezentate sintetic date

bibliografice necesare înțelegerii temei propuse. Sunt descrise date privind: epidemiologia și caracteristicile speciei *E. coli*, fenomenul de antibioretistență prin mecanismul enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) la *E. coli* și identificarea fenotipică și caracterizarea moleculară a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL.

Partea a doua a tezei se întinde pe 92 de pagini, ce cuprind 42 imagini/ 21 tabele, 249 de titluri bibliografice și este structurată în cinci capitole.

Capitolul 4, descrie în mod succint cadrul organizatoric și instituțional în care s-au desfășurat cercetările.

Capitolul 5, cuprinde „*Scopul și obiectivele tezei*”, care și-a propus de a investiga și caracteriza tulpinile de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) izolate de la porci și îngrijitorii din ferme, ce au utilizat sau nu anterior cefalosporine.

Prezentul studiu evaluează situația actuală privind portajul și potențialul zoonotic al tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de ESBL, analiza modelului de rezistență la antibiotice non-beta-lactamice pentru unele tulpini de *E. coli* sintetizatoare ESBL pozitive izolate și stabilirea gradului de înrudire genetică a tulpinilor de enterobacterii ESBL izolate de la porcii abatorizați cu cele izolate de la personalul care lucrează în fermele de unde au provenit suinele sacrificate.

Obiectivele propuse pentru atingerea scopului au fost:

- recoltarea probelor de conținut cecal de la porcii abatorizați și de la personalul din ferme;
- prelucrarea microbiologică a probelor prin: preîmbogățirea neselectivă, izolarea selectivă a tulpinilor de *E. coli* prezumtiv ESBL/AmpC (screening-ul ESBL/AmpC), încadrarea taxonomică a tulpinilor izolate în urma screening-ului ESBL și confirmarea fenotipică ca fiind producătoare de ESBL/AmpC a tulpinilor de *E. coli* identificate;
- caracterizarea rezistenței la antibioticele non-beta-lactamice pentru izolatele de *E. coli* prezumtiv producătoare ESBL/AmpC;
- caracterizarea moleculară a tulpinilor de *E. coli* izolate în urma detecției ESBL, în vederea identificării principalelor gene ce codifică enzimele beta-lactamază cu spectru extins;
- încadrarea tulpinilor de *E. coli* în grupurile filogenetice;
- amplificarea și secvențierea genelor implicate în sinteza acestor enzime;
- detecția tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele responsabile de codificarea enzimelor ESBL.

Capitolul 6, intitulat „*Detecția tulpinilor de E. coli producătoare de ESBL izolate de la porcine și om*”, descrie etapa de izolare și identificare a tulpinilor producătoare de ESBL/AmpC și confirmarea fenotipică a acestora.

Pe durata a trei ani consecutivi: 2016, 2017 și 2018, au fost examinate 200 de probe de conținut cecal recoltat de la suinele abatorizate și 32 probe coprologice recoltate de la personal medical și îngrijitori de suine. În urma detecției ESBL, din totalul de 232 de probe au fost izolate 123 (53.02%) de tulpini de *E. coli* prezumtiv ESBL, dintre care 118/200 de origine animală și 5/32 de origine umană.

Toate izolatele bacteriene (de origine umană și animală) dezvoltate pe mediul specific agar MacConkey suplimentat cu cefotaxim (MC+CTX), au fost confirmate fenotipic ca fiind ESBL/AmpC.

După analiza rezultatelor obținute pe probele de origine animală, în funcție de județul de origine al probelor, procentul de tulpini *E. coli* prezumtiv producătoare de ESBL este cuprins în intervalul 51-70, după cum urmează: pentru Botoșani, 51.72% (45/87), pentru Suceava, 55.56% (25/45) iar pentru Iași - 70.59% (48/68). Pentru probele de origine umană, 2 izolate de *E. coli* sintetizatoare ESBL/AmpC au fost din județul Iași și 3 din Botoșani.

Pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins s-a folosit metoda microdiluției în bulion. În urma realizării testelor de sinergie, dintre acid clavulanic și ceftazidim și/sau a acidului clavulanic și cefotaxim s-au obținut următoarele fenotipuri: ESBL 77/118 (65.25%), ESBL+AmpC 5/118 (4.23%) și AmpC 36/118 (30.50%). Pentru cele 5 izolate de origine umană obținute, fenotipul majoritar identificat a fost ESBL 3/5 (60%), urmat de fenotipul ESBL+AmpC 1/5 (20%) și AmpC 1/5 (20%).

În urma testării prin metoda microdiluției în bulion, pentru tulpinile confirmate fenotipic ca producătoare de ESBL/AmpC, s-a stabilit și gradul de rezistență/sensibilitate la alte clase de antibiotice, după cum urmează: beta-lactamine (100% rezistență la ampicilină), sulfonamide (rezistență la sulfamethoxazol 96/118 (81.36%) și 76/118 (64.41%) la trimethoprim. Cele 5 tulpini de origine umană au prezentat rezistență la sulfamethoxazole -3/5 (60%) și la trimethoprim -2/5 (40%).

În ce privește categoria fluoroquinolonelor, raportarea arată că nivelul de rezistență la ciprofloxacin și acid nalidixic a fost peste 50%, astfel că din numărul total de tulpini de origine animală testate, 66/118 (55.93%) au fost rezistente la ciprofloxacin, iar 74/118 (62.71%) la acidul nalidixic (NAL). Dintre izolatele de origine umană, atât pentru ciprofloxacin cât și pentru acidul nalidixic, s-au înregistrat 3/5 (60%) tulpini rezistente.

Capitolul 7, denumit „*Caracterizarea substratului molecular al tulpinilor de E. coli ESBL pozitive izolate de la porci abatorizați și de la personal din ferme*”, cuprinde analiza moleculară efectuată urmărind principalele gene ce codifică enzimele ESBL/AmpC.

În acest capitol au fost caracterizate molecular tulpinile de *E. coli* ESBL/AmpC prin identificarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL/AmpC, s-a realizat identificarea unor markeri genetici asociați cu rezistența mediată plasmidic la fluoroquinolone sau colistin și încadrarea izolatelor de *E. coli* în principalele grupuri filogenetice.

Dintre cele 5 grupuri principale de enzime ESBL de tipul CTX-M-U, s-a urmărit identificarea celor mai frecvente: CTX-M-1, TX-M-9, TEM, SHV, OXA. Din cele 118 tulpini testate molecular, la 72/118 (61 %) s-a identificat prezența genei *bla*_{CTX-M-U}. Dintre acestea, 44/72 (61.11%) au aparținut grupului CTX-M-1, 18/72 (25 %) grupului CTX-M-9, iar 10/72 (13.89%) tulpini de origine animală, cu semnal pozitiv pentru gena *bla*_{CTX-M-U}, nu au aparținut niciunuia dintre cele două grupuri menționate anterior.

Prezența genelor *bla_{SHV}* a fost identificată la 44/118 (37.28%) tulpini de origine animală, în timp ce *bla_{TEM}* doar la 2/118 tulpini (1.69%) dintre izolate, iar *bla_{OXA}* la o singură tulpină de origine animală 1/118 (1,40%).

Prevalența genelor *bla_{CTX-M}* pentru **izolatele umane** este de 80% (4/5). Pentru grupul de enzime CTX-M-1, 3/4 (75%) tulpini au fost pozitive, iar pentru grupul CTX-M-9 nu au fost identificate gene. De asemenea, ca și în cazul izolatelor de origine animală, o tulpină (25%) nu a aparținut niciunuia din cele 2 grupuri de enzime analizate.

Identificarea genelor *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{OXA}* pentru tulpinile de origine umană au condus la identificarea genei *bla_{SHV}*, în proporție de 20% (1/5), iar genele *bla_{TEM}* și *bla_{OXA}* nu au fost identificate la nicio tulpină analizată.

Datorită faptului că prezența fenotipului AmpC maschează de cele mai multe ori fenotipul ESBL, prevalența tulpinilor AmpC pozitive a fost calculată consecutiv testării moleculare. În urma investigațiilor efectuate la nivel molecular, având ca țintă gena *bla_{CIT-M}*, pentru 35/118 (29.66 %) izolate de origine animală și 1/5 (20%) de origine umană au fost obținute rezultate pozitive.

Toate tulpinile au fost testate molecular pentru genele *bla_{qnrA}*, *bla_{qnrB}* și *bla_{qnrS}*, ce codifică rezistența la fluoroquinolone și *mcr-1* și *mcr-2*, care codifică rezistența mediată plasmidic la colistin.

Numărul total de tulpini de origine animală rezistente la fluoroquinolone a fost de 22/118, dintre care 1/118 (0.85 %) pozitivă pentru gena *bla_{qnrA}*, 3/118 (2,54 %) pozitive pentru gena *bla_{qnrB}* și 18/118 (15.25 %) pozitive pentru gena *bla_{qnrS}*.

Spre deosebire de tulpinile de origine animală analizate, în cazul izolatelor umane nu a fost pusă în evidență nicio tulpină pozitivă pentru genele *bla_{qnrA}*, *bla_{qnrB}*, *bla_{qnrS}*.

În ceea ce privește rezistența la colistin, s-a observat că 3/118 (2.54%) tulpini de *E. coli* de origine animală sunt rezistente la colistin, pe baza identificării genei *mcr-1*. La nici o tulpină nu a fost semnalată prezența genei *mcr-2*, iar pentru izolatele de origine umană nu a fost identificată niciuna din cele două gene.

Mai mult, tulpinile pozitive pentru gena *mcr-1* au fost analizate din punct de vedere molecular și pentru prezența genelor ce codifică grupul CTX-M-1, gene SHV și *qnrS*, ceea ce înseamnă că aceste izolate sunt rezistente nu doar la colistin ci și la antibiotice beta-lactamine, inclusiv la cefalosporine de generația a treia și fluoroquinolone.

Lotul nostru de tulpini de *E. coli* ESBL (118 de la suine și 5 de la personalul din fermă) au fost analizate filogenetic. Analiza filogenică a arătat că toate tulpinile de *E. coli* se încadrează în cele 4 grupuri principale: A, B1, B2 și D, conform combinației a trei markeri genetici.

Tulpinile de *E. coli* sintetizatoare ESBL de proveniență animală au fost **atribuite în principal grupului filogenetic A, 37/118 (31.24%), filogrupului B1, 25/118 (21.18 %)**, urmate de 23/118 (19.49%) filogrup D și 20/118 (16.94%) filogrup B2. Alte 13/118 (11.15%) nu au putut fi încadrate.

Analizând izolatele de la suine, proporția de 52,42% a tulpinilor comensale (A, B1) este mai mare decât proporția tulpinilor extraintestinale, 36.43% (B2, D). În conclu-

zie, cele două tipuri de tulpini evoluează concomitent în cadrul fermelor de unde au fost abatorizate suinele luate în acest studiu.

Din cele 5 tulpini de origine umană analizate, filogrupurile detectate au fost A și B2, în procente egale de 40%, filogrupurile B1 și D nu au fost identificate iar una (20%) nu a aparținut niciunui filogrup.

Capitolul 8 detaliază „*Analiza filogenetică a genelor ce codifică enzimele ESBL identificate la tulpinile de E. coli*”. Pentru realizarea acestui obiectiv, am selectat 21 de tulpini de *E. coli* caracterizate molecular din perspectiva genelor ce codifică enzimele CTX-M, 17 de origine animală și 4 de origine umană. Secvențierea s-a realizat prin tehnica Sanger, externalizată către laboratorul Macrogen Europa.

În urma analize secvențelor obținute, s-a observat că 11/17 (64.7%) din tulpini sunt purtătoare ale genei *bla*_{CTX-M-1}, restul tulpinilor prezentând genele *bla*_{CTX-M-15} (1/17), *bla*_{CTX-M-3} (1/17), *bla*_{CTX-M-8} (1/17) și *bla*_{CTX-M-9} (1/17). Pentru 2 tulpini nu am obținut rezultate în urma secvențierii. Pentru izolatele de origine umană, la toate cele 4 tulpini secvențiate s-a identificat gena *bla*_{CTX-M-1}.

Gena *bla*_{CTX-M-1} a fost cea mai predominantă în determinarea rezistenței mediată plasmidic la cefalosporine de generația a 3-a la izolatele de *E. coli* de la porcii abatorizați și în izolatele de *E. coli* de origine umană.

Gena *bla*_{CTX-M-8}, care este în general raportată rar, a fost identificată în lotul nostru de tulpini de la porcii abatorizați, aceasta fiind prima raportare în regiunea de Nord-Est a României.

În **capitolul 9**, sunt redate un număr de 18 concluzii finale.

SUMMARY

The use of medicinal substances, for prophylactic and curative purposes, but also to increase the productivity yield, leads to improved animal health, reduced values of impact indicators associated with bacterial infectious diseases, but promotes the development and spread of antibiotic resistance.

One of the consequences of the uncontrolled administration of antibiotics is the modification of the bacterial population, through the continuous selection of resistant bacterial clones, regardless of whether they are pathogenic or commensal.

Increased resistance of zoonotic bacteria to antibiotics has become a global, major public health issue. The risk of ineffective treatment drives the subject of antimicrobial resistant zoonotic bacteria to be a topic of real interest, in both human and veterinary medicine. The holistic approach of the "One Health" concept includes the evaluation of the possible links between animals, humans and the environment. The transmission of resistant bacteria to people living on or near farms, as well as to consumers of products of animal origin, is scientifically proved by identification of resistance genes in strains isolated from both humans and animals.

Among the bacterial processes of continuous adaptation is the increasing resistance to antimicrobials, due to the administration, in some cases excessively, of these drugs. The appearance of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the faecal microflora of farm animals represents an obvious risk of food contamination, which can become major vectors for the transport of ESBL in the human population.

The continuous detection and characterization of ESBL-producing *E. coli* strains is necessary in terms of the impact on the food chain of healthy pigs, as a possible reservoir of *Enterobacteriaceae*. Currently, in *Enterobacteriaceae*, one of the most important resistance mechanisms, reducing even the efficacy of modern broad-spectrum cephalosporins, is based on the production of enzymes, mediated by plasmids, which inactivate these compounds by hydrolyzing their beta-lactam ring.

The present study demonstrates an increased frequency of ESBL synthesizing *E. coli* strains in pig farms with high consumption of third or fourth generation cephalosporins and indicates plasmid-mediated transfer between pigs and farmers.

Confirmation of interspecific transfer can be made based on the identification of the CTX-M-1 gene in animal and human isolates.

The doctoral thesis entitled "Investigations on antibiotic resistance and zoonotic risk associated with *Escherichia coli* strains isolated from pigs" is structured, according to the standards, in two parts and includes a number of 142 pages.

The first part, which contains the "Current State of Knowledge", comprises 22 pages, being structured in three chapters. It comprises a synthesis of bibliographic data,

necessary to understand the proposed topic. Relevant information on the epidemiology and characteristics of *E. coli* species, the phenomenon of antibiotic resistance through the mechanism of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) enzymes in *E. coli* and the phenotypic identification and molecular characterization of ESBL synthesizing *E. coli* strains are described.

The second part of the thesis covers 92 pages, including 42 images / 21 tables, 249 bibliographic titles and is structured in five chapters.

Chapter 4 briefly describes the organizational and institutional framework in which the research was conducted.

Chapter 5 contains “*The purpose and objectives of the thesis*”, which aims to investigate and characterize ESBL synthesizing *E. coli* strains isolated from pigs and farm caretakers, with or without a previous recorded usage of cephalosporins.

The present study assesses the carriage, transmission and zoonotic potential of ESBL-synthesizing *E. coli* strains, analyzes the model of non-beta-lactam antibiotic resistance for some ESBL-synthesizing *E. coli* strains isolates, and establishes the genetic relatedness of the ESBL-producing enterobacteria strains isolated from slaughtered pigs with those isolated from staff working on farms where the slaughtered pigs came from.

The proposed objectives in order to achieve the overall goal were:

- collecting caecal content samples from slaughtered pigs and farm staff;
- microbiological processing of samples by: non-selective preenrichment, selective isolation of presumptive ESBL / AmpC (ESBL / AmpC screening) *E. coli* strains, taxonomic classification of strains isolated from ESBL screening and phenotypic confirmation as producing ESBL / AmpC of identified *E. coli* strains;
- characterization of the resistance to non-beta-lactam antibiotics for presumptive *E. coli* isolates producing ESBL / AmpC;
- molecular characterization of *E. coli* strains, isolated following ESBL detection, in order to identify the main genes encoding extended-spectrum beta-lactamase enzymes;
- classification in phylogenetic groups of the *E. coli* strains;
- amplification and sequencing of genes involved in the synthesis of these enzymes;
- detection of the types of plasmids on which the genes responsible for the coding of ESBL enzymes are found.

Chapter 6, entitled “*Detection of ESBL producing E. coli strains isolated from pigs and humans*”, describes the isolation and identification steps of ESBL / AmpC producing strains and their phenotypic confirmation.

During three consecutive years: 2016, 2017 and 2018, 200 samples of caecal content collected from slaughtered pigs and 32 coprological samples collected from medical staff and pig caregivers were examined.

Following ESBL detection, 123 (53.02%) of presumptive ESBL producing *E. coli* strains were isolated from a total of 232 samples, of which 118/200 were of animal origin and 5/32 of human origin. All bacterial isolates (of human and animal origin) developed

on specific cepotaxime-supplemented MacConkey agar medium (MC + CTX) were phenotypically confirmed as ESBL / AmpC.

After analysing the results obtained on samples of animal origin, depending on the county of origin of the samples, the percentage of *E. coli* strains presumably producing ESBL is in the range 51-70, as follows: for Botoșani - 51.72% (45 / 87), for Suceava - 55.56% (25/45) and for Iași - 70.59% (48/68). For the samples of human origin, 2 isolates of ESBL / AmpC producing *E. coli* originated from Iași County and 3 from Botoșani.

The broth microdilution method was used for phenotypic confirmation of ESBL synthesizing *E. coli* strains. Following the synergy testing, the following phenotypes were obtained between clavulanic acid and ceftazidime and / or clavulanic acid and cefotaxime: ESBL 77/118 (65.25%), ESBL + AmpC 5/118 (4.23%) and AmpC 36 / 118 (30.50%). For the 5 isolates of human origin obtained, the major identified phenotype was ESBL 3/5 (60%), followed by the ESBL + AmpC phenotype 1/5 (20%) and AmpC 1/5 (20%).

Following broth microdilution testing, for the ESBL / AmpC producing strains, phenotypically confirmed, the degree of resistance / sensitivity to other classes of antibiotics was also established, as follows: beta-lactams (100% ampicillin resistance), sulfonamides resistance to sulfamethoxazole 96/118 (81.36%) and 76/118 (64.41%) to trimethoprim. The 5 strains of human origin were resistant to sulfamethoxazole - 3/5 (60%) and trimethoprim - 2/5 (40 %).

Regarding the category of fluoroquinolones, the report shows that the level of resistance to ciprofloxacin and nalidixic acid was over 50%, thus, of the total number of strains of animal origin tested, 66/118 (55.93%) were resistant to ciprofloxacin and 74/118 (62.71%) to nalidixic acid (NAL). Of the isolates of human origin, both for ciprofloxacin and for nalidixic acid, 3/5 (60%) resistant strains were recorded.

Chapter 7, entitled “*Characterization of the molecular substrate of the positive ESBL-producing E. coli strains isolated from slaughtered pigs and farm staff*”, includes the molecular analysis performed regarding the main genes encoding the ESBL / AmpC enzymes.

In this chapter, ESBL / AmpC -synthesizing *E. coli* strains were molecularly characterized by identifying the main genes encoding ESBL / AmpC enzymes, identifying genetic markers associated with plasmid-mediated resistance to fluoroquinolones or colistin and classifying *E. coli* isolates in the main phylogenetic groups.

Of the 5 main groups of ESBL enzymes of the CTX-M-U type, it was aimed at identifying the most common: CTX-M-1, TX-M-9, TEM, SHV, OXA. Of the 118 strains molecularly tested, in 72/118 (61%) was identified the presence of the *bla*_{CTX-M-U} gene. Of these, 44/72 (61.11%) belonged to the CTX-M-1 group, 18/72 (25%) to the CTX-M-9 group, and 10/72 (13.89%) strains of animal origin, with a positive signal for the gene *bla*_{CTX-MU}, did not belong to either of the two groups mentioned above.

The presence of *bla*_{SHV} genes was identified in 44/118 (37.28%) strains of animal origin, while *bla*_{TEM} genes only in 2/118 strains (1.69%) of the isolates and *bla*_{OXA} in a single strain of animal origin 1/118 (1.40%).

The prevalence of *bla*_{CTX-M} genes for **human isolates** is 80% (4/5). For the CTX-M-1 enzyme group, 3/4 (75%) strains were positive, and for the CTX-M-9 group no genes were identified. Also, as in the case of animal isolates, one strain (25%) did not belong to any of the 2 groups of enzymes analysed.

Identification of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes in the analysis of the strains of human origin led to the identification of the *bla*_{SHV} gene, in proportion of 20% (1/5), and the *bla*_{TEM} and *bla*_{OXA} genes were not identified in any of the analysed strain.

Due to the fact that the presence of the AmpC phenotype most often masks the ESBL phenotype, the prevalence of positive AmpC strains was calculated following molecular testing. Following molecular investigations targeting the *bla*_{CIT-M} gene, positive results were obtained for 35/118 (29.66%) strains of animal origin and 1/5 (20%) of human origin.

All strains were tested for the *bla*_{qnrA}, *bla*_{qnrB} and *bla*_{qnrS} genes, which encode fluoroquinolone resistance and *mcr-1* and *mcr-2*, which encode plasmid-mediated resistance to colistin.

The total number of fluoroquinolone-resistant strains, of animal origin, was 22/118, of which 1/118 (0.85%) positive for the *bla*_{qnrA} gene, 3/118 (2.54%) positive for the *bla*_{qnrB} gene and 18/118 (15.25 %) positive for the *bla*_{qnrS} gene. Dissimilarly to the strains of animal origin analysed, no positive strain was detected for the *bla*_{qnrA}, *bla*_{qnrB}, *bla*_{qnrS} genes in the human isolates.

With reference to colistin resistance, it was observed that 3/118 (2.54%) *E. coli* strains of animal origin are resistant to colistin, based on the identification of the *mcr-1* gene. No *mcr-2* gene was reported in any strain. Furthermore, in the case of human isolates, neither gene was identified.

Moreover, the *mcr-1* gene positive strains were also molecularly analyzed for the presence of genes encoding the CTX-M-1 group, SHV and qnrS genes, which means that these isolates are resistant not only to colistin but also to beta- lactamines, including third-generation cephalosporins and fluoroquinolones.

Our batch of *E. coli* ESBL strains (118 from pigs and 5 from farm staff) were phylogenetically analysed. Phylogenetic analysis showed that all *E. coli* strains fall into the 4 main groups: A, B1, B2 and D, according to the combination of three genetic markers.

The ESBL-synthesizing *E. coli* strains of animal origin were mainly attributed to phylogenetic group A, 37/118 (31.24%), phylogroup B1, 25/118 (21.18%), followed by phylogroup D - 23/118 (19.49%) and phylogroup B2 -20/118 (16.94%). Some strains, 13/118 (11.15%), could not be assigned to any of the previously mentioned groups.

Analyzing the pigs isolates, the proportion of 52.42% of commensal strains (A, B1) is higher than the proportion of extraintestinal strains, 36.43% (B2, D).

In conclusion, the two types of strains evolve simultaneously in the farms from where the slaughtered pigs included in this study originated.

Of the 5 strains of human origin analysed, the detected phylogroups were A and B2, in equal percentages of 40%, phylogroups B1 and D were not identified and one (20%) did not belong to any phylogroup.

Chapter 8 details “*Phylogenetic analysis of ESBL - encoding genes identified in E. coli strains*”. To achieve this goal, we selected 21 strains of *E. coli* molecularly characterized for the presence of genes encoding CTX-M enzymes, 17 of animal origin and 4 of human origin. The sequencing was performed using the Sanger technique, outsourced to Macrogen Europe.

Following the analysis of the obtained sequences, it was observed that 11/17 (64.7%) of the strains are carriers of the *bla*_{CTX-M-1} gene, and the rest of the strains presented *bla*_{CTX-M-15} (1/17), *bla*_{CTX-M-3} (1/17), *bla*_{CTX-M-8} (1/17) and *bla*_{CTX-M-9} (1/17). For 2 strains we did not obtain results after sequencing. The *bla*_{CTX-M-1} gene was identified in all 4 sequenced strains of human origin.

Moreover, the *bla*_{CTX-M-1} gene was the most predominant in determining the plasmid-mediated resistance to 3rd generation cephalosporins in *E. coli* isolates from slaughtered pigs and in *E. coli* isolates of human origin.

The *bla*_{CTX-M-8} gene, which generally is rarely reported, was identified in our batch of strains from slaughtered pigs, this being the first report in the North-East region of Romania.

Chapter 9 comprises the final 18 conclusions.

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII
PART I – THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA ȘI CARACTERISTICILE SPECIEI *E. COLI*

CHAPTER I. EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERISTICS OF THE *E. COLI* SPECIES

Bacteriile din genul *Escherichia*, alături de cele încadrate în alte 50 de genuri, au apartenență la familia: *Enterobacteriaceae*, Ordinul: *Enterobacteriales*, Clasa: *Gama Proteobacteria*, Phylum: *Proteobacteria* (Răpunțean S. ș.a., 2017). Nișa ecologică a acestor microorganisme este tubul digestiv (Euzebiy, 2004), de unde se răspândesc în mediul exterior (Everest, 2007).

Familia *Enterobacteriaceae* este deosebită, întrucât include cea mai largă paletă de microorganisme de interes medical, având implicații deosebite în patologia intestinală și extraintestinală la om și animale (Răpunțean ș.a., 2005, Răpunțean, ș.a., 2017). Speciile bacteriene încadrate în această familie au aceleași caractere generale reprezentate de nișa ecologică, morfologie asemănătoare, predominând formele cocobacilare sau bacilare. Sunt germeni Gram negativi, ciliați sau neciliați, nesporulați, facultativ anaerobi, cu spectru fermentativ larg față de glucoză, glucide și polialcoolii, oxidază-negativi, catalază pozitivi și reduc nitrații în nitriți (Scheutz, 2005). Posedă atribute de patogenitate comune, determinate de un set de factori reprezentați de toxine citolitice, endotoxine, enterotoxine, structuri care favorizează aderența și invazivitatea precum și multiplicarea intracelulară (Ludwing, 1996).

1.1. Încadrare taxonomică și caractere generale

Escherichia coli (*E. coli*) reprezintă specia tip a genului *Escherichia*, denumire provenită de la Theodor Escherich, cel care a izolat pentru prima dată această bacterie, cunoscută anterior sub denumirea de „*Bacterium coli commune*” (Trif, 1996; Răpunțean ș.a., 2017).

Morfologic, bacteriile aparținând speciei *E. coli* se prezintă sub formă cocobacilară sau bacilară, cu dimensiuni variabile de 2-6/1-1,5 μm, dispuse izolat sau în perechi, nesporulate, ciliate (cili dispuși peritrich) și flagelate, aerobe sau facultativ anaerobe, lactozo-pozitive (Scheutz, 2005). Unele tulpini sunt capsulate sau prezintă structuri similare (microcapsule) (Bayer ș.a., 1985). Diversitatea antigenică a tulpinilor de *E. coli* este caracteristică sușelor încadrate în tipul 2 (manoză-rezistente), tulpinile încadrate în tipul 1 fiind omogene din punct de vedere antigenic (manoză-sensibile).

Manoza are proprietatea de a inhiba specific aderența speciei *E. coli* la celulele epiteliale (Rugieri ș.a., 1985).

Colibacilii se dezvoltă ușor pe o gamă largă de medii de cultură, în limite largi de temperatură (10-43°C) și pH (7,2-7,8) (Buiuc ș.a., 2009).

Sunt bacterii la care apar diverse fenotipuri de patogenitate dar sunt condiționat patogene. Prezența genelor cromozomiale și mai ales variațiile factorilor de patogenitate ca urmare a transferului plasmidic și a conversiei lizogenice, determină la aceste enterobacterii constituirea a numeroase patotipuri (Buiuc, ș.a. 2009):

- *E. coli* enteropatogene (EPEC) - au capacitate ridicată de aderență la enterocite, fiind responsabile de apariția enteritelor la om, porc și iepure (Milon, ș.a. 1999; Ochoa ș.a., 2011; Luppi, 2017);
- *E. coli* enterotoxigene (ETEC) - produc enterotoxine și prezintă adezine cu ajutorul cărora colonizează intestinul și au drept consecință apariția enteritei la om, miel, vițel, iepure și carnivore (Qadri, ș.a., 2005);
- *E. coli* enteroinvazive (EIEC) - au capacitate ridicată de a invada și distruge mucoasa colonului la om și maimuță, producând dizenterie (Pasqua, 2017);
- *E. coli* enterohemoragice sau necrotoxigene (EHEC/NTEC) - dețin hemolizine, citotoxine și produc aerobactină, fiind implicate în infecții enterice și extraenterale la bovine, porcine, câini și om (Blanco, ș.a., 1998, Rapuntean, ș.a. 2017);
- *E. coli* verotoxigene (VTEC/STEC) - produc verotoxine și dețin adezine cu care se atașează pe microvilozitățile enterocitelor pe care le distrug și sunt responsabile de sindromul uremic și enterita hemoragică la om, dizenteria bovinelor, boala edemelor la porc (Woodward ș.a., 2002);
- *E. coli* enteroagregative (EAggEC) - au capacitate de aderență agregativă la celulele specializate HEp-2, având capacitatea de a produce simptome enterice, gastroenterită și crampe la om (Smith ș.a., 1997; Nataro ș.a., 1987; Wanke ș.a. 1998);
- *E. coli* difuz aderente (DAEC) - se caracterizează prin prezența aderenței difuze la celulele HEp-2, dar rolul său patogenetic nu este cunoscut pe deplin (Mansan-Almeida, ș.a., 2013).

Colibacilii sunt sensibili la o gamă largă de antibiotice, cele mai eficiente substanțe antimicrobiene fiind streptomicinele, polimixinele, sulfamidele, chimioterapicele, etc. (Răpunțean ș.a., 1998). Studii de actualitate au arătat că la majoritatea tulpinilor de *E. coli* izolate de la om și animale s-a instalat fenomenul de antibioretistență față de macrolide, aminoglicozide, beta-lactamice, sulfonamide, etc. (Maciucă, 2014; Cozma, 2017).

1.2. Ecologia și epidemiologia speciei *E. coli*

E. coli, ca și celelalte enterobacterii, sunt omniprezente în microbiota intestinală a animalelor și omului, fiind larg răspândite și în mediul înconjurător și participând la ecosisteme de reciclare biologică (Buiuc ș.a., 2009).

Aceste microorganisme se găsesc în special în tubul digestiv al animalelor și oamenilor, predominând în colon, de unde sunt eliminate prin materiile fecale și răspândite

în diverse medii naturale. Rezistența acestora în mediu variază, de la săptămâni la luni de zile, dar manifestă sensibilitate la antisepticele uzuale (Carp-Cărare ș.a., 2015).

Cu puține excepții (*E. hermanii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*), *E. coli* este considerată un patogen intestinal, fiind una din cele mai implicate specii în sindroamele digestive și uremice. Factori genetici bine cunoscuți determină diferite comportamente de patogenitate, astfel încât *E. coli* poate trece de la statutul de saprofît comensal la cel de patogen (Buiuc ș.a., 2009, Denamur ș.a., 2010). În ecologia speciei *E. coli*, un rol important în declanșarea procesului infecțios îl are interacțiunea colibacililor cu celulele sistemului gazdă care sunt capabile să fagociteze (Miskinyte ș.a., 2013).

Ubicvitatea acestor specii a dus la apariția infecțiilor nosocomiale, care ocupă o incidență apropiată de cea a stafilococilor, piobacililor și enterococilor (Hidron ș.a., 2008). Pe lângă capacitatea patogenă a acestor microorganisme, un alt factor de risc îl reprezintă rezistența la grupe extinse de antibiotice, responsabile de eșecul terapeutic.

Studiile de specialitate, arată că 41,9%, dintre tulpinile de *E. coli* implicate în infecțiile nosocomiale urinare, au manifestat rezistență față de quinolone, iar 33,3% dintre acestea, fiind producătoare de enzime beta-lactamaze (ESBL), având astfel o rezistență crescută față de o varietate de antibiotice beta-lactamice, peniciline, cefalosporine și monobactame (Jimenez-Alcaide ș.a., 2015). Tot mai des sunt raportate focare nosocomiale în unitățile de terapie intensivă neonatală, produse de tulpini *E. coli* RMA (rezistență multiplă la antibiotice) (Giuffrè ș.a., 2016).

De asemenea, colibacilii sunt printre cei mai importanți patogeni nosocomiali implicați în meningite la om (Morris ș.a., 1999, Elliott ș.a., 2018).

E. coli reprezintă cel mai bun indicator al contaminării fecaloide (Grădinaru ș.a., 2016). Prin răspândirea fecalelor în mediu, animalele, ca și omul, pot fi rezervoare de contaminare a apei, a subproduselor agroalimentare și furajelor, fiind responsabile și de apariția toxiinfecției alimentare. În ultimul deceniu, cel mai important focar de toxiinfecție alimentară din Europa, produsă de o tulpină de *E. coli* producătoare de toxină Shiga (STEC), a apărut în 2011, la un număr semnificativ de pacienți din Germania, ca urmare a consumului de legume proaspete. În aceeași perioadă, au fost semnalate cazuri similare în alte 12 țări (ECDC, 2012).

1.3. Caracterizarea fenomenului de antibioretistență la *Enterobacteriaceae*

Generic, antibioticele (gr. *anti*-împotrivă; *bios*-viață) sunt substanțe de origine biologică, semisintetică sau sintetică, cu efect distructiv (bactericid) sau inhibitor asupra multiplicării bacteriene (bacteriostatic), utilizate în terapia antiinfecțioasă (Philip, 2012).

La scurt timp după descoperirea penicilinei de către Alexander Fleming în 1928, au existat preocupări cu privire la posibilitatea apariției antibioretistenței (Sternbach ș.a., 1992). Descoperirea și comercializarea pe scară largă a substanțelor antimicrobiene încă din primele decenii ale secolului XX, au revoluționat medicina umană și veterinară, fiind

posibilă terapia antiinfecțioasă față de o gamă largă de entități morbide care au evoluat de-a lungul timpului.

Abuzul și autoadministrarea din medicina umană precum și utilizarea irațională în terapia antiinfecțioasă și ca promotor de creștere în zootehnie, au dus la apariția acestui fenomen îngrijorător, numit antibiorezistență (Elliott ș.a., 2018).

Microorganismele rezistente la antibiotice exercită o presiune continuă pe managementul asistenței medicale. Genele de rezistență se răspândesc rapid între populațiile enterobacteriilor, diminuând opțiunile terapeutice antiinfecțioase.

Rezistența la antibiotice este una dintre principalele probleme de sănătate publică actuală și în următorul deceniu. În ultimii ani, bacteriile Gram-negative, în special bacteriile din familia *Enterobacteriaceae*, au dobândit sau au selectat multe gene de rezistență (Carlet ș.a., 2011; Bush ș.a., 2011; Lowe ș.a., 2012; Măciucă ș.a., 2015; Măciucă ș.a., 2019). În general, la bacteriile Gram negative, pot să apară și în mod natural mecanismele de rezistență, cum ar fi beta-lactamazele mediate cromozomal (Iredell ș.a., 2016).

Inițial, aceste mecanisme de rezistență au fost semnalate la *Klebsiella pneumoniae*, dar în ultima perioadă sunt întâlnite tot mai frecvent la tulpinile de *E. coli* (Baquero, 2009, Măciucă ș.a., 2019).

Incidența tot mai ridicată a tulpinilor de enterobacteriacee rezistente la antibiotice, și în mod special la carbapeneme, se datorează, de asemenea, turismului medical, tulpinile bacteriene fiind “importate” din zone geografice precum India, Africa de Nord, Asia, etc. (Gupta ș.a., 2011).

Apariția tulpinilor de *E. coli* și *Klebsiella pneumoniae* rezistente la carbapeneme a dus la utilizarea unor antibiotice la care s-a renunțat inițial datorită toxicității ridicate, precum colistina (Canton ș.a., 2012; Măciucă ș.a., 2019). În aceeași perioadă, au fost descrise tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* și *Acinetobacter* rezistente la ceftazidime, carbapeneme și chinolone, tulpini cu genele SHV și CTX-M-15 implicate în focare nosocomiale (Calbo ș.a., 2011; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Măciucă ș.a., 2019).

Rezistența antimicrobiană este un fenomen natural influențat de factori multipli. Rezistența la antibiotice poate fi transferată vertical de la o generație bacteriană la alta, fie prin transfer orizontal, între tulpini și specii bacteriene asemănătoare. Pe lângă utilizarea excesivă a antibioticelor, există și o transmitere încrucișată a tulpinilor rezistente în comunitățile umane și animale, de la animale la oameni sau de la oameni la animale (Levy, 1982).

La nivel internațional, au fost realizate studii care au raportat izolarea de tulpini ESBL de la păsări, animale de rentă, animale de companie și de la animalele sălbatice. Un astfel de studiu, efectuat în Olanda, a descris o contaminare cu *Enterobacteriaceae* producătoare de ESBL la peste 80% din eșantioanele recoltate de pe carcassele de pui destinate consumului uman (Leverstein-van Hall, ș.a., 2011). Tulpini similare au fost detectate la testarea eșantioanelor rectale prelevate de la oamenii care lucrează în sectorul zootehnic (Leverstein-van Hall, ș.a., 2011, Măciucă, 2014), de la puii broiler (Măciucă, 2014) sau de la proprietarii animalelor de companie (Cozma, 2017).

În România, incidența enterobacteriilor cu rezistență multiplă la antibiotice este în topul valorilor prezentate în rapoartele anuale ale rețelelor europene de supraveghere a rezistenței antimicrobiene (EARS-NET, 2017). Sunt semnalate creșteri semnificative ale rezistenței individuale sau combinate dintre cefalosporine de generația a III-a și aminoglicozide sau/și fluorochinolone (EARS-NET, 2017).

La bacterii, rezistența la antibiotice poate fi indusă prin diverse mecanisme de natură endogenă (mutațiile) sau de natură exogenă (recombinările și transferul de plasmide) (Guguianu, 2002). Prin urmare, principalele căi de transfer de gene între bacterii sunt: plasmidele, integronii și transpozonii.

Plasmidele sunt molecule de ADN extracromozomal dublu catenar și constituie principalul mijloc de diseminare a genelor responsabile de apariția rezistenței la diverse antibiotice. Transportul mai multor gene de rezistență pe aceeași plasmidă conferă rezistență multiplă, prin care o genă de rezistență poate fi co-selectată pentru utilizarea antibioticelor, altele decât cele cărora le conferă rezistență (Partridge, 2015).

Plasmidele pot avea una sau mai multe gene de rezistență și prin urmare joacă un rol important în difuzarea acestora. În timp ce anumite plasmide pot fi mobilizate de alte elemente genetice mobile sau transferate de bacteriofagi (transducție), cele mai multe dintre ele sunt autotransferabile. În acest caz, funcțiile de transfer sunt codificate de gene plasmidice și astfel plasmidele conjugative au cel puțin o origine a replicării și toate genele necesare sintezei pilului sexual pentru transfer prin conjugare. Plasmidele pot fi, de asemenea, încorporate în cromozomi și pot contribui prin acesta la dinamica genelor pentru rezistență (Swartz, 2000).

La *Enterobacteriaceae*, transferul orizontal al plasmidelor cu gene de rezistență la antibiotice poate avea loc în nișa microbiotei intestinale, precum și în mediul ambiant (apa, solul, deșeurile de grajd) sau orice alt loc în care bacteria și antibioticul vin în contact (Carlo, 2012; Bevan ș.a., 2017).

Există mai multe modalități de transfer de plasmide între comunitățile bacteriene: conjugarea, transformarea și transducția (Thomas ș.a., 2005, Bennett, 2008).

Transformarea corespunde unei achiziții de gene de către bacterii care au capacitatea (bacteriile competente) de a capta ADN-ul gol și de a-l integra prin recombinare între regiunile omologe din genomul lor. Faptul că acest fenomen poate apărea numai între bacteriile foarte apropiate filogenetic și faptul că puține specii bacteriene nu sunt în mod natural competente, limitează influența transformării în termeni de difuzie a genelor de rezistență la anumite specii (Furushita, 2003).

Genele de rezistență pot apărea la majoritatea bacteriilor dar selecția de rezistență apare cel mai adesea în microorganismele nepatogene, care alcătuiesc majoritatea lumii microbiene. Bacteriile care fac parte din microbiota găsită la oameni și animale, precum și cele din mediul înconjurător, sunt prin urmare surse importante de rezistență (Carlo, 2012). Rezistența este răspunsul la presiunea selectivă exercitată de un antibiotic care trebuie să aibă un contact prelungit cu populația bacteriană și pentru aceasta este necesar ca

substanța antimicrobiană să se afle la o concentrație care să permită supraviețuirea bacteriei (concentrația sub-inhibitoare sau sub-terapeutică) (Nóbrega, ș.a., 2014).

Rezistența datorată unei mutații se dezvoltă, de obicei, în cursul perioadei de administrare a substanței antimicrobiene, putând fi constatată ușor și rapid în baza lipsei de eficiență a tratamentului. Aceasta este considerată una dintre cele mai grave amenințări la adresa sănătății umane, deoarece unii agenți patogeni devin rezistenți la mai multe clase de antibiotice (rezistență multiplă la antibiotice = RMA) (Nóbrega ș.a., 2014).

Fenomenul de rezistență al tulpinilor bacteriene sintetizatoare de beta-lactamaze este asociat genetic și cu rezistența la alte antibiotice non-betalactamice și, în consecință, tratamentul infecțiilor provocate de aceste bacterii ESBL este limitat (Nóbrega ș.a., 2014).

Rezistența bacteriană la antibiotice și potențialul ei zoonotic a atras o atenție considerabilă la nivel mondial (Allen ș.a., 2010).

Așadar, rezistența la antibiotice afectează nu numai sănătatea publică umană la scară globală ci va afecta în cele din urmă mai multe sectoare din comunitățile noastre și nu în ultimul rând, producția de alimente (World Bank, 2017).

1.4. Mecanisme de antibiorezistență identificate la *E. coli*

Mecanismele de rezistență s-au dezvoltat ca rezultat al interacțiunii dintre microorganisme și mediul lor. Rezistența poate fi naturală sau dobândită, prin mutații sau prin intermediul unor gene de rezistență. Ele se realizează prin mecanisme variate, precum: pompe de eflux, modificări ale permeabilității pereților bacterieni, inactivarea enzimatică a antibioticelor, modificări ale țintei acțiunii antibioticului (Mihăescu ș.a., 2007; Nikaido ș.a., 2009; Blair ș.a., 2015).

Pompele Efflux sunt localizate în membrana citoplasmatică și pot expulza din celula bacteriană compuși toxici, inclusiv antibiotice. Acest mecanism de rezistență afectează o gamă largă de clase antimicrobiene, cu riscul dezvoltării co-rezistenței.

Permisivitatea scăzută, în care multe antibiotice au ținte intracelulare, antibioticul trebuie să pătrundă în membrana externă și/sau citoplasmică pentru a-și efectua efectul antimicrobian. Mecanismele de rezistență bacteriană care modifică permeabilitatea sunt fie reglarea în jos a proteinelor de membrană, fie modificarea structurii proteinelor. În ambele cazuri, antibioticul este împiedicat să difuzeze în celula bacteriană. Producția de enzime permite bacteriilor să inactiveze antibioticul. Unele enzime, cum ar fi beta-lactamazele, degradează antibioticele, în timp ce alte enzime, cum ar fi aminoglicozidele, modifică antibioticele.

Modificarea locului țintă al antibioticului este unul dintre cele mai frecvente mecanisme de rezistență a bacteriilor la antibiotice, ceea ce duce la legarea greșită a moleculei antimicrobiene de ținta sa. Modificările țintă pot consta fie în alterarea enzimatică a site-ului țintă, fie în mutații punctuale în genele care codifică situl țintă, ori în înlocuirea/ocolirea țintei inițiale.

Aceste mecanisme de rezistență ajută bacteriile în competiția lor, pentru nișe ecologice și prin urmare ele sunt elemente fundamentale ale vieții microbiene și reprezintă

fenomene evolutive normale (Mihăescu ș.a., 2007). Enterobacteriile folosesc mecanisme diferite pentru a dezvolta rezistența la beta-lactamine și pot produce tulburări de permeabilitate, prin modificarea porinelor și a sistemelor de eflux, care permit expulzarea antibioticelor la exterior sau prin modificarea țintei bacteriene, de exemplu site-uri de legare a penicilinei (PLP), care împiedică producerea peretelui bacteriilor (Bonnet, 2004).

Rezistența naturală la *E. coli*, și în general la bacteriile Gram negative, este un tip pasiv de rezistență și se datorează capacității membranei externe de a rezista la penetrarea unor antibiotice sau poate fi un proces activ, atunci când se activează pompele de eflux și elimină medicamentul ca urmare a gradientului de concentrație (Mihăescu ș.a., 2007; Nikaido ș.a. 2009, Blair ș.a., 2015).

Rezistența dobândită este un proces etapizat și constă în capacitatea acestor bacterii de a supraviețui și de a se multiplica în prezența anumitor antibiotice, pe care inițial le-a tolerat (Mihăescu ș.a., 2007; Nikaido ș.a. 2009; Blair ș.a., 2015).

Rezistența la antibiotice are întotdeauna și un **suport genetic**. Rezistența poate fi **dobândită cromozomial** și prin urmare este întotdeauna transmisibilă vertical, de la o generație la alta. Se cunoaște faptul că la nivelul fiecărei populații bacteriene există un rezervor important de gene de rezistență care probabil au evoluat în timp cu scopul de a se apăra față de bacteriocine (antibiotice produse de alte bacterii) (Davies, 2010; Levy, 2004). La nivelul secvențelor nucleotidelor cromozomului bacterian apar mutații, spontane sau induse de antibiotice, pentru fiecare tip de rezistență (Hachler ș.a., 1991). Aceste mutații sintetizează noi proteine care au capacitatea de a interfera cu activitatea antibioticelor agresoare (Mărculescu, ș.a., 2007). Aceste mutații sunt definitive dar pot să dispară dacă s-a întrerupt expunerea la acel antibiotic (Swartz, 2000).

O altă origine a genelor de rezistență este atribuită **mutațiilor** apărute la genele care au rol în biosinteză și care au evoluat ca urmare a modificării substratului față de care acționa inactivând astfel și antibioticele (Davies, 2010; Levy, 2004). În general, mutațiile au o frecvență de apariție redusă dar la bacterii, datorită multiplicării rapide, antibiorezistența se exprimă mult mai rapid și se stabilizează la următoarele generații, genele de rezistență fiind transferate vertical (Davies, 2010). Dezvoltarea mecanismelor de rezistență a contribuit la apariția bacteriilor multirezistente, foarte rezistente (multidrog-rezistente) și cu rezistență la toate antibioticele (pandrog-rezistente). Orice tulpină bacteriană poate deveni din ce în ce mai rezistentă la antibiotice și cu posibilitatea de a răspândi genele care codifică factorii de rezistență în cadrul aceleiași specii sau la speciile înrudite filogenetic.

Studierea metagenomului intestinal a scos în evidență o comunitate microbiană extrem de complexă (Peterson ș.a., 2009), în care există multiple transferuri de gene, mai ales între speciile de *Enterobacteriaceae* (Cremet ș.a., 2012; Schjorring ș.a., 2011) dar și între tulpinile patogene și tulpinile din microbiota intestinală (Stecher ș.a., 2012).

Riscul de diseminare a bacteriilor cu multiplă rezistență față de antibiotice, provenite din intestin, este foarte ridicat, întrucât densitatea bacteriană în materiile fecale este uriașă (Guet-Revillet ș.a., 2012; Van Duin ș.a., 2016).

CAPITOLUL II. FENOMENUL DE ANTIBIOREZISTENȚĂ PRIN MECANISMUL ENZIMELOR BETA-LACTAMAZE CU SPECTRU EXTINS (ESBL) LA *E. COLI*

CHAPTER II. THE ANTIBIO-RESISTANCE PHENOMENA BY THE MECHANISM OF THE EXTREME SPECTRUM (ESBL) BETA-LACTAMAZZE ENZYMES IN *E. COLI*

Antibioticele beta-lactamice sunt o clasă importantă de substanțe antimicrobiene utilizate frecvent în terapia antiinfecțioasă (Rodriguez-Villalobos ș.a., 2006; Kong ș.a., 2010). Aceste antibiotice au acțiune bactericidă și se caracterizează prin prezența constantă a ciclului beta-lactam asociat cu cicluri variabile și lanțuri laterale (Cavallo ș.a., 2004).

2.1. Definiția și caracterizarea enzimelor ESBL

Beta-lactamazele cu spectru extins (ESBL) sunt enzime versatile, codate plasmidial, cu o gamă de structuri moleculare limitată, produse de bacterii Gram negative, care degradează antibioticele beta-lactamice (Giske ș.a., 2009, Bush, 2018).

Beta-lactamazele sunt întâlnite la majoritatea enterobacteriilor, frecvența cea mai ridicată fiind la speciile *E. coli* și *Klebsiella pneumoniae*, având rolul de a proteja celula bacteriană față de toate substanțele antimicrobiene beta-lactamice, inclusiv peniciline, cefalosporine din toate generațiile, monobactami și carbapeneme (Müller-Pebody ș.a., 2004, Bush, 2018). Apariția carbapenemazelor s-a sincronizat cu prezența tulpinilor de *E. coli* multidrog-rezistente, ceea ce a dus la o îngrijorare serioasă în lumea medicală întrucât s-au limitat extrem de mult soluțiile terapeutice (Müller-Pebody ș.a., 2004; Bush, 2018).

Beta-lactamazele numără în prezent aproape 2800 de proteine unice (Bush, 2018) și se caracterizează prin capacitatea de a cliva inelul beta-lactamic al antibioticelor, inactivându-le (Bush, 2018). La nivel celular, genele pentru beta-lactamaze sunt prezente în plasmide sau cromozomi și pot fi transferate de către transpozomi în alte locații interioare. De asemenea, ele pot fi transferate ușor și între specii sau genuri înrudite filogenetic, ceea ce explică răspândirea vastă a antibio rezistenței (Mărculescu ș.a., 2007).

Prin urmare, bacteriile Gram-negative enterice aparținând familiei *Enterobacteriaceae* devin rezistente la aceste clase de agenți beta-lactami atunci când dobândesc o genă ESBL și produc enzima (Müller-Pebody ș.a., 2004).

Enzimele ESBL sunt omniprezente la nivel mondial, o singură estimare apreciind peste 1,5 miliarde de persoane colonizate cu *Enterobacteriaceae* producătoare de ESBL (Woerther ș.a., 2013).

2.2. Clasificarea moleculară și funcțională a enzimelor ESBL

Clasificarea beta-lactamazelor se realizează pe baza caracteristicilor moleculare și funcționale.

Au fost elaborate două sisteme de clasificare a acestor enzime: sistemul Ambler, care grupează beta-lactamazele în funcție de structura enzimatică/moleculară în 4 clase (A-D) (fig. 2.1) și sistemul Bush-Jacobz-Medeiros, care structurează beta-lactamazele pe baza proprietăților funcționale ale enzimelor, luând în considerare profilurile de substrat și de inhibiție (tabelul 2.1) (Bush și Jacoby, 2010).

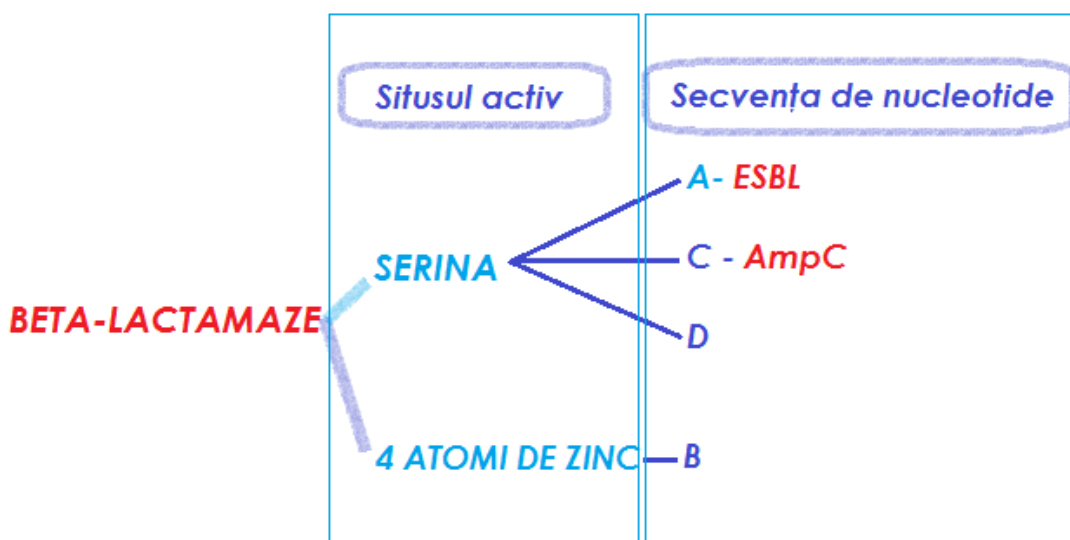


Fig. 2.1. Clasificarea moleculară a beta-lactamazelor (după clasificarea Ambler)

Fig. 2.1. Molecular classification of beta-lactamases (according Ambler classification)

Clasele A, C și D includ enzime care hidrolizează substraturile lor formând o enzimă acil printr-o serină cu situs activ, în timp ce lactamazele din clasa B sunt metaloenzime care utilizează cel puțin un ion de zinc cu situs activ pentru a facilita hidroliza lactozei (Bush, 1989).

Tabelul 2.1 prezintă o versiune extinsă a schemei de clasificare funcțională propusă inițial de Bush în 1989 (Bush, 1989) și extinsă în 1995 (Bush ș.a., 1995).

Scheme de clasificare pentru beta-lactamazele bacteriene (Bush ș.a., 1995)

Schemes for bacterial beta-lactamases (Bush ș.a., 1995)

Bush-Jacoby Group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Clasa moleculară	Antibioticele hidrolizate	Inhibat de CA/TZB	Inhibat de EDTA	Enzimă reprezentativă
1	1	C	Cefalosporinele	nu	nu	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NIb	C	Cefalosporinele	nu	nu	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pencilinele	da	nu	PC1
2b	2b	A	Pencilinele Cefalosporinele timpurii	da	nu	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporine spectru extins, monobactamii	cu da	nu	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pencilinele	nu	nu	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporine spectru extins, monobactami	cu nu	nu	TEM-50
2c	2c	A	Carbapenicinele	da	nu	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilinele, cefepimele		nu	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilină	da	nu	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporine spectru extins	cu variabil	nu	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenemele	variabil	nu	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporine spectru extins	cu variabil	nu	CepA
2f	2f	A	Carbapenemele	da	nu	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1)	Carbapenemele	variabil	nu	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B(B3)		da	da	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
NI	4	B(B2)	Carbapenemele	da	da	CphA, Sfh-1

CA: acid clavulanic, TZB: tazobactam; NI: nu este inclus.

După clasificarea Ambler, enzimele ESBL ale familiilor TEM, SHV și CTX-M aparțin clasei A, enzimele ESBL din familia OXA sunt incluse în clasa D, în timp ce clasa C include beta-lactamazele AmpC. Genele care codifică enzimele beta-lactamaze pot fi cromozomale și intrinseci, adică prezente în mod natural în speciile bacteriene, adesea denumite cromozomale ("c") sau dobândite ("a"), obținute prin transfer între bacterii.

Deși o abordare structurală este cel mai ușor și cel mai puțin controversat mod de a clasifica un set atât de divers de enzime, o clasificare funcțională oferă posibilitatea de a relaționa aceste enzime variate cu rolul lor clinic, adică prin asigurarea rezistenței selectivă la diferite clase de antibiotice lactice.

Au fost adăugate schemei noi subgrupuri funcționale, ca urmare a identificării și extinderii familiilor majore de lactamază în care variațiile continuă să fie identificate în mod regulat.

La fel ca în clasificările funcționale anterioare, enzimele au fost aliniate pe baza capacității lor de a hidroliza clasele specifice de beta-lactamaze și pe proprietățile de inactivare a beta-lactamazelor și ale inhibitorilor, acidul clavulanic, sulbactamul și tazobactamul. Urmează o descriere a fiecăruia dintre grupurile funcționale.

Grupa 1 - cefalosporinaze.

Enzimele din grupa 1 sunt cefalosporinazele aparținând clasei moleculare C, care sunt codificate pe cromozomii multor *Enterobacteriaceae* și ale altor câteva organisme (Jacoby, 2009). Sunt mai active pe cefalosporine decât benzilpenicilina, dar rezistente la inhibarea acidului clavulanic și active pe cefalotine, cum ar fi cefoxitina. Acestea au o afinitate ridicată pentru aztreonam (valorile K_i mai mici de 1 până la 2 nM), în contrast cu cefalosporinazele din clasa A (Bush, 1988; Bush, 1982.).

Dintre enzimele mediate de plasmidă, cele aparținând, grupului 1, (CMY, ACT, DHA, FOX, MIR) sunt cunoscute începând cu anul 1989, dar în prezent sunt mai puțin frecvente decât enzimele subgrupul 2b (TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL). (Jacoby, 2009).

Grupa 2 - serine beta-lactamaze.

Beta-lactamazele din grupa funcțională 2, includ clasele moleculare A și D și reprezintă cel mai mare grup de beta-lactamaze, datorate în principal identificării crescânde a ESBL în ultimii 20 de ani.

Subgrupa 2a, a penicilinei (PC1) reprezintă un grup mic de beta-lactamaze cu un spectru relativ limitat de activitate hidrolitică și sunt beta-lactamazele predominante la cocci Gram pozitivi, incluzând stafilococii (Kernodle ș.a., 1989.) și ocazional enterococii (Zscheck ș.a., 1991).

Aceste enzime hidrolizează în mod preferențial benzilpenicilina și mulți derivați ai penicilinei, cu o hidroliză slabă a cefalosporinelor, carbapenemelor sau monobactamilor, de obicei la un nivel de 10% pentru benzilpenicilină sau ampicilină. O excepție este hidroliza facilă a nitrocefinei de către subgrupa enzimelor 2a.

Subgrupa 2b de beta-lactamaze hidrolizează ușor penicilinele și cefalosporinele timpurii, cum ar fi cefaloridina și cefalotina și sunt puternic inhibitate de acidul clavulanic și tazobactam. Acestea includ enzimele TEM-1, TEM-2 și SHV-1, cele mai frecvente beta-lactamaze mediate de plasmidă identificate în anii 1970 și la începutul anilor 1980 (Matthew, 1979; Roy ș.a., 1983).

De la descoperirea enzimelor beta-lactamice în anul 1989 de către Bush K. (Bush K, 1989), au mai fost descrise cel puțin 9 enzime de tip TEM și 29 de enzime de tip SHV

aparținând subgrupului 2b. În plus, numărul acestora este într-o continuă creștere, fiind caracterizate și alte beta-lactamaze identificate la izolatele rezistente.

Subgrupul 2be cuprinde ESBL-uri. Aceste enzime cu spectru larg păstrează activitatea împotriva penicilinelor și cefalosporinelor subgrupului 2b beta-lactamaze și, în plus, hidrolizează una sau mai multe oxiamino-beta-lactame, cum ar fi cefotaximă, ceftazidimă, aztreonam și benzilpenicilina.

Primul și cel mai mare set din subgrupa **2be** a fost derivat prin substituții de aminoacizi din TEM-1, TEM-2 și SHV-1 care și-au lărgit spectrul substratului cu costul unei activități de hidrolizare mai scăzută pentru benzilpenicilină și cefaloridină (Queenan ș.a., 2004).

Enzimelor TEM și SHV li s-au alăturat enzimele ESBL CTX-M care funcționează similar, dar mai rapid și care sunt legate de beta-lactamazele determinate cromozomal la speciile de *Kluyvera* (Bonnet, 2004). După cum sugerează și numele, cele mai multe (dar nu toate) enzime CTX-M hidrolizează cefotaximă mai ușor decât ceftazidimă. De asemenea, multe enzime hidrolizează cefepime. Spre deosebire de enzimele TEM sau SHV, enzimele CTX-M ESBL sunt inhibitate de tazobactam, cu cel puțin un ordin de mărime mai bun decât de acidul clavulanic (Bonnet, 2004; Walther-Rasmussen ș.a., 2004).

Există enzime ESBL mai puțin obișnuite, fără legătură cu TEM, SHV sau CTX-M, incluzând BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 și membri ai familiilor enzimelor PER și VEB. Caracteristic, subgrupul 2be beta-lactamaze rămâne sensibil la inhibarea acidului clavulanic, caracteristică utilizată în detectarea lor de laboratoarele clinice (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009).

La nivel genic, bla_{CTX-M} s-a răspândit cu succes în ultimii ani, înlocuind bla_{TEM} și bla_{SHV} ca genă care codifică ESBL în Europa (Bonnet, 2004, Livermore ș.a., 2007).

Enzimele **subgrupului 2br** sunt lactamaze cu spectru larg care au dobândit rezistență la acidul clavulanic (IC₅₀ 1 M) și inhibitori înrudiți, păstrând totodată un spectru de activitate al subgrupului 2b. În prezent, 36 din cele 135 de enzime TEM caracterizate funcțional au această proprietate și includ enzime precum TEM-30 și TEM-31 (IRT-2 și, respectiv, IRT-1), precum și 5 dintre enzimele corespunzătoare funcționale 72 SHV. În acest sens, tulpinile de *E. coli* sintetizatoare ESBL producătoare de CTX-M, TEM și SHV au fost izolate de la animalele de fermă (păsări, porc, bovine, pui) în diferite țări (Meunier ș.a., 2006; Ramos ș.a., 2013).

Numărul enzimelor beta-lactamice de tip CTX-M ce au fost izolate la nivel mondial a crescut dramatic și sunt în continuă creștere, ducând la o problemă terapeutică majoră. Au fost identificate peste 170 de variante alelice ale CTX-M (Ramadan ș.a., 2019). Aceste enzime sunt clasificate în cinci grupe filogenetice majore pe baza secvențelor lor genetice: CTX-M -1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Un nou grup a fost raportat recent, fiind reprezentat de CTX-M-74 și CTX-M-75 (Minarini ș.a., 2009).

Animalele de fermă și animalele de companie sunt recunoscute din ce în ce mai mult ca un rezervor pentru tulpinile de enterobacteriacee producătoare de ESBL, în special CTX-M (Mesa ș.a., 2006).

În grupa ESB, cele mai întâlnite enzime sunt CTX-M și enzimele SHV și TEM. Aceste enzime sunt transferabile orizontal și degradate de acidul clavulanic.

În cadrul aceleași grupe ESB, cu o frecvență crescută sunt întâlnit și enzimele AmpC.

Subgrupa 2br, include enzime TEM cu spectru extins, care combină rezistență relativă la inhibarea acidului clavulanic. Deși toate enzimele TEM au acid clavulanic mult mai mare decât cea a enzimelor TEM-1, pentru unele enzime din subgrupa 2br creșterea rezistenței la acid clavulanic este modestă. (Robin ș.a., 2005). În concluzie, acest nou tip de mutant complex derivat din TEM-1 (CMT-1) este capabil să confere rezistență la un nivel foarte scăzut inhibitorilor și la un nivel scăzut cefalosporinelor cu spectru extins. CMT-1 a primit denumirea TEM-50. (Sirot ș.a., 1997).

Subgrupa 2c penicilinaza se caracterizează funcțional prin capacitatea enzimelor de a hidroliza carbenicilina sau ticarcilina cel puțin 60%, la fel de rapid ca benzilpenicilina, cu cloxacilină sau oxacilină hidrolizată la valori mai mici de jumătate din cele pentru benzilpenicilină (Bush, Jacoby, Medeiros, 1995).

Subgrupa 2ce conține RTB-4 (CARB-10) cu spectru extins, descris recent, cu activitate extinsă împotriva cefepimei și ceftipromului (Potron ș.a., 2009).

Subgrupa 2d, include enzime beta-lactamaze cu spectru extins, care se disting prin capacitatea lor de a hidroliza cloxacilina, oxacilina și benzilpenicilina. Prin urmare, sunt cunoscute sub denumirea de enzime OXA. Enzimele legate de OXA cuprind acum a doua cea și cea mai mare familie de enzime beta-lactamaze.

În noul **subgrup 2de** sunt incluse enzimele hidrolizante ale cloxacilinei sau oxacilinei, care conțin oximino-beta-lactamele dar nu carbapenemele. Majoritatea enzimelor 2de sunt derivate din OXA-10 prin 1 până la 9 substituții de aminoacizi și includ enzime precum OXA-11 și OXA-15. Rezistența la ceftazidime este de obicei mai pronunțată decât rezistența la cefotaximă sau aztreonam. Cu toate acestea, organismele care produc câteva oxacilinaze, cum ar fi OXA-1 sau OXA-31, pot fi susceptibile la ceftazidime dar rezistente la cefepime (Aubert ș.a., 2001).

Noul **subgrup 2df**, al enzimelor OXA, include beta-lactamaze cu activități de hidrolizare a carbapenemelor. Enzimele OXA apar cel mai frecvent la *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* și sunt de obicei produse de gene localizate pe cromozomi (Walther-Rasmussen ș.a., 2006) dar în cadrul aceleiași familii (*Enterobacteriaceae*) au fost identificate și enzimele OXA-23 și OXA-48, care sunt mediate plasmidic. (Bush, Jacoby, Medeiros, 1995).

Enzimele subgrupului 2df au fost împărțite în nouă grupuri conform omologiilor de aminoacizi.

Deși enzimele din subgrupa 2d sunt definite în funcție de capacitatea lor de a hidroliza cloxacilina sau oxacilina, doar câteva subgrupuri de enzime 2df au fost testate folosind aceste substraturi (Walther-Rasmussen ș.a., 2004).

Caracteristicile subgrupului 2e, cefalosporinaze, includ capacitatea de a hidroliza cefalosporine cu spectru extins și de a fi inhibată de acidul clavulanic sau tazobactam.

Enzimele subgrupului 2e pot fi diferențiate de enzimele AmpC prin afinitatea lor slabă pentru aztreonam, în contrast cu valorile M_{Km} (K_i) observate pentru aztreonam cu enzimele din grupul 1 (Bush, 1989).

Numărul enzimelor 2e a rămas stabil din 1995 și nu se așteaptă să includă mulți membri noi în viitor, probabil deoarece multe dintre aceste enzime, sunt acum identificate ca ESBL. Serin-carbapenemazele, din subgrupa 2f, populează grupa moleculară A, în substraturi distincte pentru aceste enzime, care pot fi inhibitate mai bine de tazobactam și de acidul clavulanic. Cefalosporinele cu spectru extins, cum ar fi ceftazidima, nu sunt bine hidrolizate de către enzimele SME și IMI-1 dar aztreonamul poate fi degradat de majoritatea acestora, cu excepția GES-3 și GES-4. Grupa IMM-urilor, precum lactamazele IMI-1 și NMC-1, sunt constituenți ai enzimelor subgrupului 2f cromozomiale (Queenan ș.a., 2004).

Grupa 3, metalo-beta-lactamazele (MBL), un grup unic de beta-lactamaze, atât structural cât și funcțional, sunt de obicei produse în combinație cu o a doua sau a treia lactamază, în izolatele din probele clinice. Acestea diferă structural de celelalte beta-lactamaze prin cerința lor pentru un ion de zinc la locul activ. Funcțional, acestea s-au distins în trecut, în primul rând prin capacitatea lor de a hidroliza serin-carbapenemazele, dar unele beta-lactamaze au dobândit în timp această capacitate. Spre deosebire de serin beta-lactamaze, ESBL-urile au o afinitate slabă sau o capacitate hidrolitică pentru monobactam și nu sunt inhibitate de acidul clavulanic sau de tazobactam.

Pe baza caracterizării biochimice mai extinse, a numărului tot mai mare de metalo-lactamaze (MBL), au fost descrise doar două subgrupuri funcționale 3a și 3b.

Subgrupa **3a** include principalele enzime ESBL, codificate de plasmide, cum ar fi enzimele IMP și VIM, care au apărut la nivel global, cel mai frecvent în bacteriile nefermentative dar și în *Enterobacteriaceae* (Queenan ș.a., 2007).

Subgrupa **3b** conține un grup mai mic de ESBL care hidrolizează carbapenemele în mod predilect, în contrast cu penicilinele și cefalosporinele (Queenan ș.a., 2007). Aceste enzime au fost dificil de detectat atunci când cefalosporinele cromogene, cum ar fi nitrocefina, sunt utilizate pentru a monitoriza prezența activității beta-lactamazei pe gelurile de focalizare izoelectrică sau în timpul procedurilor de purificare (Segatore ș.a., 1993).

Beta-lactamazele din grupa 4, incluse anterior în clasificarea funcțională din 1995, au fost omise în prezenta schemă. Aceste enzime, cel mai probabil, ar fi incluse într-una din grupele enzimatiche existente dacă ar fi disponibile mai multe informații despre acestea. Deoarece aceste enzime au fost încă incomplet caracterizate, nu s-a încercat clasificarea lor ulterioară. Speciile din familia *Enterobacteriaceae*, producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins, reprezintă una dintre cele mai grave probleme de rezistență din lume.

Genele *bla* au profitat de numeroasele mecanisme de transfer și de gene orizontale între bacterii pentru a se răspândi în noile gazde și pentru a deveni parte a plasmidelor cu multirezistență, care sunt acum comune în izolatele clinice.

Având în vedere acești factori, este o predicție sigură că beta-lactamazele vor continua să evolueze, la fel ca schemele de clasificare necesare pentru descrierea lor. În timp ce atât rezervoarele umane, cât și cele animale sunt supuse unor proceduri de supraveghe-

re, prezența bacteriilor multidrog-rezistente în mediu este mai puțin documentată. Prin urmare, tabloul epidemiologic global este incomplet și există încă numeroase lacune de informații privind interacțiunea dintre mediu și animale în ceea ce privește transferul încrucișat de gene rezistente.

Aceste tulpini producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins au fost, de asemenea, izolate din surse naturale variate de mediu. Rezervorul de gene de rezistență din mediu, este considerat a fi alcătuit dintr-un amestec de determinanți ai rezistenței naturale, reprezentate de om și populațiile de animale, dar și de efectele selective ale poluanților, ce pot co-selecta elemente genetice mobile sau gene multiple de rezistență (Egervärn ș.a., 2017; Kittinger ș.a., 2016). Enzimele CARBA, cum ar fi metalo-beta-lactamazele (MBL), conferă activitate de carbapenemază (Giske ș.a., 2009).

Enzimele CTX-M au fost descoperite pentru prima dată în 1980, după anul 1995 a început răspândirea pe toate continentele iar de atunci numărul genelor au crescut enorm. Genele bla_{CTX-M} sunt împărțite în 5 filogrupuri: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 și CTX-M-25 (Birkett ș.a., 2007, D'Andrea ș.a., 2013).

Dintre cele 5 filogrupuri, cel mai frecvent întâlnit este CTX-M-1 și include gena bla_{CTX-M-15}, care este dominantă la nivel global (Giske ș.a., 2009).

2.3. Transmiterea enzimelor ESBL în populațiile de *E. coli*

Transmiterea genelor care codifică enzimele ESBL se poate produce fie prin apariția unor clone bacteriene, fie prin transfer orizontal de gene.

În diseminarea orizontală, plasmidele care conțin gene de rezistență sunt răspândite între bacteriile din aceeași și/sau specii diferite. Flora intestinală este un rezervor ideal pentru genele de rezistență ale antibioticelor, în care multitudinea de bacterii din specii diferite pot interacționa, cel mai adesea fără a provoca boli.

Plasmidele sunt molecule mici, circulare, de ADN bicatenar, ce reproduc în esență cromozomul din celula bacteriană, pe care o găzduiește, fiind diferită de ADN-ul cromozomial al celulei. Plasmidele sunt foarte diverse, iar genomul acestora, prezintă elemente genetice mobile, care pot deplasa genele în jurul plasmidei, precum și între cromozom și plasmidă.

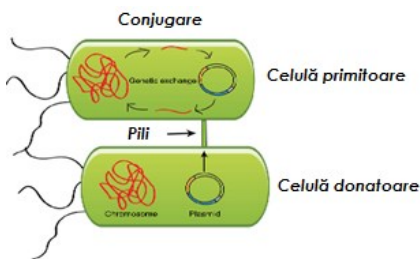


Fig. 2.2 Conjugarea bacteriană.

Fig. 2.2 Illustration of bacterial conjugation (https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-bacterial-conjugation_fig1_266946176)

Elementele genetice mobile de pe plasmide, sunt transpozonii, intergonii și secvența de inserție. Acestea au regiuni comune cu genele ESBL. Plasmidele au dezvoltat modalități de a-și asigura persistența în celula bacteriană (fig. 2.2).

Când se folosesc antibiotice, apar tulpini rezistente și se acumulează un avantaj selectiv. Acest lucru crește probabilitatea ca genele importante pentru supraviețuire să fie diseminate în continuare. Plasmidele pot conține gene de rezistență la mai multe clase de antibiotice. Acest lucru poate explica multirezistența des întâlnită printre bacteriile producătoare de ESBL.

2.4. Prevalența și distribuția tulpinilor de *E. coli* ESBL pozitive identificate în populațiile de porcine

Există studii care au arătat că la nivel mondial atât la oameni cât și la animale s-au detectat bacterii sintetizatoare de beta-lactamaze (ESBL) cu spectru extins, ce apar în urma utilizării cefalosporinelor din a treia și a patra generație în rândul animalelor de rentă.

Animalele de rentă au fost sugerate ca o sursă potențială de transmitere a bacteriilor cu spectru extins de beta-lactamaze (ESBL) care produc infecții la om, prin contact direct sau prin consum de produse din carne contaminate, ceea ce duce la colonizarea tractului intestinal și în cele din urmă la infecții severe (Lazarus ș.a., 2015).

La animalele de fermă, colonizarea prin bacterii producătoare de ESBL poate fi considerată o problemă de sănătate publică, deoarece transmiterea către oameni nu poate fi ignorată. Printre motivele acestei colonizări neobișnuite, un factor de risc important ar putea fi considerat și utilizarea antibioticelor în tratamente profilactice pentru prevenirea infecțiilor bacteriene (Dos Santos ș.a., 2013).

E. coli sintetizatoare de beta-lactamaze (ESBL) reprezintă o problemă din ce în ce mai mare pentru sănătatea publică. Produsele alimentare de origine animală și animalele sunt considerate surse relevante pentru colonizarea oamenilor cu *E. coli* ESBL (Sharp ș.a., 2014, Hille ș.a., 2014). Dintre aceste enzime, cele de tip CTX-M sunt frecvente și într-o continuă creștere. (Cantón ș.a., 2012, Carattoli, 2013).

Enterobacteriaceele producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL), reprezintă una dintre cele mai grave probleme de rezistență din lume. La nivel genetic, gena *bla*_{CTX-M} s-a răspândit cu succes în ultimii ani, înlocuind *bla*_{TEM} și *bla*_{SHV} ca genă care codifică ESBL în Europa (Bonnet, 2004; Livermore ș.a., 2007). Enzimele CTX-M cuprind o familie diversificată genetic și cu creștere rapidă iar până în prezent au fost descrise cinci grupuri, numite grupurile CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 și CTX-M-25.

Într-un studiu de caz, consumul de carne de porc a fost incriminat ca un factor de risc pentru colonizarea cu *E. coli* sintetizatoare de ESBL (Leistner ș.a., 2013).

Studii recente au arătat colonizarea frecventă a porcilor (Friese ș.a., 2013; Von-Salviati ș.a., 2014) cu bacterii producătoare de ESBL. Pe baza comparației genelor ESBL identificate, se presupune că consumul alimentelor (Leverstein-van Hall ș.a., 2011; Over-

devest ș.a., 2011; Depoorter ș.a., 2012) provenite de la astfel de animale este considerat sursă relevantă pentru colonizarea oamenilor cu *E. coli* producătoare de beta-lactamază cu spectru extins (ESBL), (Sharp ș.a., 2014, Hille ș.a., 2014).

Apariția bacteriilor producătoare de ESBL la diferite animale de rentă a fost raportată din ce în ce mai mult în ultimii ani (Carattoli, 2008; Li XZ ș.a., 2007). Enzima de tip CTX-M a fost raportată frecvent la animalele de rentă din Europa iar acesta a fost și primul tip descoperit la porcii danezi în 2005 (Aarestrup ș.a., 2006). Același tip predominant a fost raportat și într-un studiu realizat pe tulpini de *Enterobacteriaceae* de la porcii sacrificați în Danemarca, urmat de CTX-M-14, CTX-M-2 și CTX-M-15 (Agerso ș.a., 2012).

În Europa, CTX-M-1 și CTX-M-14 au fost detectate, de asemenea, la porcii din Spania (Brinas ș.a., 2005), Franța, Regatul Unit și Elveția (Blanc ș.a., 2006; Briñas ș.a., 2005; Geser ș.a., 2012; Horton ș.a., 2011; Meunier ș.a., 2006).

În studiile daneze, *E. coli* sintetizatoare de ESBL a fost izolată și identificată cu o frecvență crescută la fermele de porci, în urma unui consum mare de cefalosporină cu spectru extins (Cavaco ș.a., 2008, Jorgensen ș.a., 2010) și drept urmare, a fost interzisă administrarea antibioticelor în industria daneză a porcilor.

Apariția ESBL la animalele de producție, are implicații importante asupra sănătății omului, deoarece aceste enzime sunt factori determinanți de rezistență, relevanți ce pot fi transmiși de la animale la oameni, fie prin achiziție din lanțul alimentar (Smet ș.a., 2009), fie prin transmitere directă către lucrătorii din ferme (Moodley și Guardabassi, 2009). Moodley și Guardabassi au detectat transferul plasmidelor IncN cu *bla*_{CTX-M-1} între porcii danezi și fermierii de porci.

Andersen și colaboratorii au investigat efectul utilizării cefalosporinei de a treia și a patra generație asupra apariției *E. coli* producătoare de cefalosporinază cu spectru extins în fermele de porci daneze; ei au arătat că utilizarea regulată anterioară de cefalosporine din a treia sau a patra generație a fost un factor de risc semnificativ pentru apariția *E. coli* producătoare de cefalosporinază la porcii din Danemarca (Andersen ș.a., 2015). Un studiu recent desfășurat în Suedia (Börjesson ș.a., 2016) a constatat că răspândirea clonală a *E. coli*, rezistentă la cefalosporină, prin consumul de alimente și de la animalele de fermă la om, a fost puțin probabilă și a existat o difuzare limitată a ESBL sau a plasmidei AmpC.

2.5. Importanța tulpinilor ESBL izolate de la porci abatorizați în contextul abordării *One Health*

Zoonozele sunt infecții transmise de la animale la oameni. Infecțiile pot fi dobândite prin expunerea directă la mediul în care supraviețuiesc animale de fermă sau prin ingestia produselor alimentare contaminate. Severitatea acestor boli la om poate varia de la simptome ușoare până la punerea vieții în pericol. Bacteriile zoonotice rezistente la antimicrobiene prezintă o îngrijorare deosebită, deoarece ar putea compromite tratamentul eficient al infecțiilor la animale și om.

Abordarea holistică a conceptului „One Health” include luarea în considerare a posibilelor legături între animale, oameni și mediu. Prin urmare, a existat o dezbatere cu privire la aspectul răspândirii continue a ESBL-urilor între animale, oameni și mediu. Fermierii s-au confruntat cu mai multe consecințe ale problemei antibioretistenței: pericolul potențial al colonizării animalelor cu bacterii rezistente la medicamente, transmiterea acestor bacterii la oameni care trăiesc în fermă sau în vecinătatea fermelor și pericolul transmiterii pentru consumatorii de produse de origine animală.

Mai mult, transferul orizontal de gene facilitează răspândirea genelor de rezistență în și între diferite specii bacteriene. Pentru a înțelege mai bine aceste legături și pentru a identifica opțiunile, pentru a reduce răspândirea rezistenței și a infecțiilor la om, este necesară o abordare integrativă precum „One Health” (Parmley ș.a., 2013, Calistri ș.a., 2013).

Utilizarea antibioticelor în medicina umană și veterinară și diseminarea lor în mediu au favorizat apariția și răspândirea microorganismelor rezistente la antibiotice. Utilizarea masivă a antibioticelor în medicina umană, medicina veterinară, producția animalelor, acvacultură și agricultură este un factor major în răspândirea și evoluția rezistenței la antibiotice (Da Costa ș.a., 2013).

E. coli sintetizatoare de beta-lactamază cu spectru extins (ESBL) a fost deja izolată separat în diferite etape ale lanțului de producție de carne de porc (Schulze-Geisthövel ș.a., 2014). Prin urmare, a existat o dezbatere continuă la nivel mondial cu privire la sursele potențiale, rutele de transmisie și factorii de risc ai acestei răspândiri continue a *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamază cu spectru extins (ESBL) între animale, oameni și mediu (Li ș.a., 2007).

Plasmidele care transportă genele ESBL sau chiar aceleași izolate de *E. coli* producătoare de ESBL ar putea fi detectate la animale și la personalul îngrijitor (Dierikx ș.a., 2012; Moodley și Guardabassi, 2009; Hammerum ș.a., 2014).

Câteva studii au semnalat prezența *E. coli* ESBL, pe de o parte la animalele de rentă, în special la porci, păsări de curte libere și bovine iar pe de altă parte în produsele alimentare din întreaga lume, fiind evidențiată transmiterea lor de la animale la oameni. (Ewers ș.a., 2012; Founou ș.a., 2016). În unele studii de caz s-a dovedit colonizarea frecventă a porcilor cu bacterii sintetizatoare de ESBL (Friesse ș.a., 2013; Von Salviati ș.a., 2014), în timp ce la om a fost demonstrat ca factor de risc consumul cărnii de porc (Leistner ș.a., 2013). Pe baza comparației genelor ESBL identificate, se presupune că expunerea prin alimente are un impact asupra probabilității de colonizare umană și/sau infecție cauzată de bacteriile producătoare de ESBL (Leverstein-van ș.a., 2011; Overdevest ș.a., 2011; Depoorter ș.a., 2012).

Problema transferului de rezistență a antibioticelor de la animale la om este adesea un punct central al dezbaterii. Există puține căi documentate de transmitere la om a bacteriilor de origine animală, rezistente la antimicrobiene. Expunerea profesională ar putea fi una din căile de transmisie. (Witte ș.a., 2007).

Rezistența la cefalosporinele de generația a treia și a patra, observată la tulpinile de *E. coli*, poate afecta și alte specii de enterobacterii iar acest lucru se întâmplă deja pe scară largă la om. Genele responsabile de sinteza ESBL sunt localizate pe structuri genetice

ce foarte mobile (plasmide) și prin urmare, extrem de transmisibile între animalele din aceeași fermă sau chiar din ferme diferite. Plasmide identice au fost deja găsite la tulpinile de *E. coli* din diferite sectoare. De asemenea, aceeași plasmidă a fost găsită în tulpinile de *E. coli* izolate de la porci la distanță de patru ani (Meunier ș.a, 2006).

Provocarea de a controla aceste probleme de sănătate publică, animală și de mediu, într-un context globalizat, justifică așadar o soluție la nivel internațional. Așa s-a dezvoltat conceptul „O singură sănătate”, ce reprezintă o abordare sistemică care, printr-o acțiune colectivă coordonată din diferite profiluri disciplinare și profesionale, integrează problemele de sănătate animală, umană, de mediu și interrelațiile acestora, pentru a le trata mai eficient.

CAPITOLUL III. IDENTIFICAREA FENOTIPICĂ ȘI CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A TULPINILOR DE *E. COLI* PRODUCĂTOARE DE ESBL

CHAPTER III. PHENOTYPICAL IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ESBL PRODUCING *E. COLI*

3.1. Identificarea fenotipică a izolatelor de *E. coli* ESBL pozitive

Identificarea fenotipică corectă și monitorizarea antibioretistenței tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) din conținutul intestinal de la animalele de rentă oferă informații valoroase despre rezervoarele de bacterii rezistente care ar putea fi transferate între animale, dar și între animale și oameni. Prin urmare, monitorizarea are relevanță atât pentru sănătatea publică, cât și pentru cea animală.

Apariția rezistenței la antimicrobiene a tulpinilor de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins poate să depindă de mai mulți factori, cum ar fi: presiunea selectivă exercitată prin utilizarea de antimicrobiene la populațiile de animale de rentă, co-selecția bacteriilor cu rezistență multiplă, răspândirea bacteriilor rezistente și diseminarea elementelor genetice (plasmide) între bacterii.

Există mai multe metode pentru detecția fenotipică a tulpinilor de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins în laborator. Principiul detecției se bazează pe cultivarea în prezența unei cefalosporine de generație a treia și a unui mediu specific pentru *Enterobacteriaceae*, în care se adaugă, într-o anumită concentrație, o cefalosporină (cefotaxime sau cefpodoxime). Pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor ESBL se utilizează diferite metode, însă cea mai frecvent utilizată este metoda discurilor combinate, care presupune utilizarea unor cefalosporine simple și/sau cefalosporine potențate cu acid clavulanic. Interpretarea se face fie pe baza diferențelor dintre diametrele zonelor de inhibiție (pentru antibiograma difuzimetrică), fie pe baza raportului de sinergie dintre cefalosporina și cefalosporina potențată cu acidul clavulanic, pentru antibiogramele de tip CMI (concentrație minimă inhibitorie).

Detecția tulpinilor producătoare de ESBL în laborator nu este întotdeauna ușoară, deoarece depinde de expresia sa fenotipică și aceasta este condiționată de cantitatea de enzimă produsă de bacterie și de prezența sau nu a altor mecanisme de rezistență. Detectarea lor se bazează pe capacitatea acestor enzime de a hidroliza cefalosporinele din a treia generație, scăzând astfel sensibilitatea bacteriilor față de aceste antibacteriene. O altă caracteristică a acestor enzime este aceea că sunt inhibitate de acidul clavulanic.

Metodologia de detecție a ESBL prin tehnica microdiluției în bulion, impune folosirea ca indicator a unei cefalosporine. Fenotipul prezumtiv sintetizator ESBL indicat, se evidențiază prin raportul sinergiilor între cefalosporine și cefalosporine și acid clavulanic. Fenotipul prezumtiv sintetizator AmpC se evidențiază și prin rezistența la cefoxitin și sensibilitatea la cefepim. Pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins se mai pot folosi și alte metode: metoda discului combinat, metoda dublu disc și E-test.

3.2. Modalități de caracterizare a substratului molecular al enzimelor ESBL

Beta-lactamazele cu spectru extins (ESBL) au fost descrise pentru prima dată în anii 1980 la tulpinile de *Klebsiella* și *E. coli*, ulterior fiind depistate și la alte specii din familia *Enterobacteriaceae*. ESBL-urile sunt un grup de enzime ce hidrolizează rapid beta-lactamazele și au capacitatea de a hidroliza toate cefalosporinele și monobactamii, (Bali ș.a., 2010) dar sunt inhibitate de beta-lactamază (acid clavulanic, sulbactam și tazobactam) (Bradford, 2001; Pitout ș.a., 2007; Giraud Morin și Fosse, 2003).

Tulpinile producătoare de ESBL pot, de asemenea, să hidrolizeze cefalosporine de generația a treia și a patra, dar nu carbapenemele. Unele grupuri de enzime beta-lactamice, ce codifică genele localizate pe plasmidă, sunt comune unor *Enterobacteriaceae* (Poole, 2004) și reprezintă o cauză majoră în transmiterea rezistenței bacteriilor gram-negative la mai multe antibiotice, fenomen denumit rezistență multiplă (RMA). Din cauza răspândirii rapide, rezistență multiplă la antibiotice (RMA), devine o amenințare serioasă pentru sănătatea umană la nivel mondial (Giraud-Morin și Fosse, 2003; Poole, 2004; Gupta, 2007).

ESBL-urile sunt mutații continue, ce produc modificări în structura aminoacizilor, determinând dezvoltarea de noi enzime care prezintă profiluri extinse de substrat. Până în prezent, există peste 400 de ESBL-uri diferite, iar acestea au fost grupate în nouă familii structurale și evolutive diferite pe baza secvenței de aminoacizi și trei grupe: TEM, SHV și CTX-M, cu 183, 134 și respectiv 103 variante. Dintre variantele ESBL menționate anterior, TEM și variabila sulfidril SHV au fost tipurile majore în unele țări, iar tipul CTX-M frecvent în alte țări (Paterson ș.a., 2003).

Detecția moleculară a genelor TEM și SHV la bacteriile producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) și modelul lor de rezistență antimicrobiană, poate furniza date utile despre epidemiologia și factorii de risc asociați cu aceste infecții (Jain et Mondal, 2008).

Beta-lactamazele cu spectru extins (ESBL) sunt o cauză importantă a rezistenței multiple transferabile în bacterii gram-negative din întreaga lume. Aceste bacterii s-au răspândit rapid și au devenit o amenințare serioasă pentru sănătatea umană în toată lumea. (Bali ș.a., 2010; Coque ș.a., 2002).

Apariția enterobacteriei rezistente la beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL), este cel mai adesea rezultatul unui mecanism în două etape, care asociază mai întâi selecția

bacteriilor comensale rezistente și apoi transferul orizontal al rezistenței între diverse specii bacteriene, dintre care unele pot fi patogene (Skurnik și Andremont, 2006). Cel mai important mecanism este legat de producerea beta-lactamazelor cu spectru extins (ESBL) (Bush și Jacoby, 2010).

Aceste enzime transferabile, coexistă adesea cu alți determinanți ai rezistenței la antibiotice și pot fi asociate cu transpozonii și integronele și duc la creșterea capacității de îmbogățire a bacteriilor cu rezistență multiplă la antibiotice (RMA) pentru mai mulți agenți antimicrobieni, precum și cu difuzarea determinanților rezistenței în rândul speciilor bacteriene (Poeta ș.a., 2009), care se remarcă prin difuzarea preferențială a ESBL-urilor de tip CTX-M (Philippon, 2013).

Enterobacteriile producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) au apărut în ultimul deceniu, reprezentând o amenințare globală pentru sănătatea umană, cu extindere și în alte medii precum ar fi la animalele de fermă, animale sălbatice, ape uzate, plante și alte surse (Ben ș.a., 2015).

Primele ESBL-uri au fost identificate în anii 1980 în derivați ai beta-lactamazelor TEM și SHV, care descompun antibioticele, cu o activitate mai restrânsă decât cefalosporinele de generația a treia. De atunci, au fost descrise peste 200 de beta-lactamaze de tip TEM și aproape 200 de enzime de tip SHV (lahey.org/studies).

O nouă familie, a beta-lactamazelor cu spectru extins (ESBL) de tip CTX-M, a fost raportată pentru prima dată în 1989 în Germania sub denumirea de CTX-M-1 (cefotaximază-Munchen) (Bauernfeind ș.a., 1990).

PARTEA A II-A CERCETĂRI PROPRII
PART II – PERSONAL CONTRIBUTION

CAPITOLUL IV. DESCRIEREA CADRULUI ORGANIZATORIC ȘI INSITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE

CHAPTER IV. DESCRIPTION OF THE ORGANIZATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK IN WHICH THE RESEARCH WAS CONDUCTED

Analizele de specialitate și cercetările s-au desfășurat în cadrul a două instituții: Laboratorul Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor (LSVSA), din cadrul DSVSA Iași și Facultatea de Medicină Veterinară din Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Iași.

LSVSA Iași îndeplinește cerințele minime de reglementare pentru orice laborator în care se manipulează culturi bacteriene și produși PCR.

LSVSA Iași dispune de un laborator modern de Bacteriologie, în care s-au desfășurat toate etapele, de la izolare, identificare și confirmare fenotipică prin metoda microdiluției în bulion până la analiza PCR a tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de ESBL.

Laboratorul de Biologie moleculară este dotat cu aparatură de ultimă generație, unde s-au realizat investigațiile moleculare PCR pentru identificarea substratului genetic al fenotipului.

Facultatea de Medicină Veterinară funcționează în cadrul Universitatea pentru Științele Vieții “Ion Ionescu de la Brad” din Iași și a fost înființată în anul 1961. În cadrul Departamentului de Sănătate publică funcționează laboratoare de cercetare noi, dotate corespunzător, dintre care și laboratorul de biologie moleculară unde s-au efectuat o parte din cercetările proprii.

CAPITOLUL V. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

CHAPTER III. AIM AND OBJECTIVES OF THE THESIS

Introducerea în terapie a substanțelor medicamentoase cu acțiune antimicrobiană a revoluționat medicina. Din păcate însă, utilizarea exagerată sau eronată a acestora a favorizat dezvoltarea și răspândirea rezistenței microbiene, aceasta devenind o importantă problemă de sănătate publică la nivel global. Producția animală modernă utilizează o cantitate semnificativă de substanțe antimicrobiene, atât în scop curativ, cât și profilactic dar și pentru creșterea randamentului productiv. Ca urmare a acestui fapt, un număr considerabil de animale sunt expuse frecvent la acțiunea antibioticelor, fiind astfel asigurate condițiile favorabile pentru emergența, dezvoltarea, răspândirea și persistența unor bacterii rezistente, cauzatoare de infecții la om sau la animale. Bacteriile zoonotice rezistente prezintă capacitatea de a se răspândi și de a infecta omul, în mod special prin intermediul alimentelor de origine animală.

Numeroasele bacterii comensale sau ambientale pot induce apariția rezistenței la agenții patogenii ai animalelor sau omului, departe de locul de prescriere al antibioticului și la interval mare de timp prin selecția naturală. **Din considerentele menționate, constatăm deosebită importanță a supravegherii și monitorizării rezistenței antimicrobiene cu referire specială la bacteriile zoonotice.** În același timp au sporit și preocupările privind standardizarea metodelor de testare a sensibilității antimicrobiene, inclusiv uniformizarea criteriilor de interpretare, care a devenit esențială pentru a asigura rezultate exacte și reproductibile.

De asemenea, genele codificatoare a determinanților de rezistență, regăsite la nivelul unor astfel de bacterii, pot fi transferate altor bacterii comensale sau patogene pentru om. Prin urmare, rezistența antimicrobiană constituie astăzi o reală problemă de siguranță alimentară pentru populația umană.

Creșterea numărului de tulpini de enterobacterii sintetizatoare de ESBL multirezistente este pusă pe seama administrării la om, în infecțiile clinice, a antibioticelor din clasa fluoroquinolonelor și a beta-lactaminelor ca medicamente de primă linie, dar și pe seama presiunii selective exercitate de tratamentele cu fluoroquinolone administrate în ferme. Acestea sunt motivele pentru care rezistența la antimicrobiene, de tip “încrucișat” și “rezistență multiplă”, este frecvent întâlnită la enterobacteriile sintetizatoare de ESBL (Ewers s.a., 2012; Rzewuska ș.a., 2015).

Detectarea markerilor rezistenței la antimicrobiene într-un eșantion reprezentativ de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins ESBL oferă date utile pentru

investigarea relației dintre apariția rezistenței și utilizarea de antimicrobiene în populațiile de bacterii izolate de la animalele de la care se obțin produse alimentare.

Identificarea fenotipică corectă și monitorizarea antibioretistenței tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) din conținutul intestinal de la animalele sănătoase producătoare de alimente oferă informații valoroase despre rezervoarele de bacterii rezistente care ar putea fi transferate între animale dar și între animale și oameni. Prin urmare, monitorizarea are relevanță atât pentru sănătatea omului, cât și pentru cea animală.

În ultimul deceniu, la nivel internațional, există un interes din ce în ce mai mare pentru studiul circulației microorganismelor între animale și om, precum și asupra implicațiilor rezistenței acestora la antimicrobiene.

Scopul acestui studiu a fost de a investiga și caracteriza *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) de la porci și îngrijitorii din ferme ce au utilizat sau nu anterior cefalosporine. Prezentul studiu și-a propus să evalueze situația actuală privind portajul și potențialul zoonotic al tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de ESBL, să analizeze modelul de rezistență la antibiotice non-betalactamice pentru unele tulpini *E. coli* ESBL pozitive izolate și să aprecieze gradul de înrudire genetică a tulpinilor de enterobacterii ESBL izolate de la porcii abatorizați cu cele izolate de la personalul care lucrează în fermele de unde au provenit suinele sacrificate.

Pentru atingerea scopului, s-au stabilit următoarele **obiective**:

- recoltarea probelor de conținut cecal de la porcii abatorizați și probe de fecale de la personalul din ferme;
- prelucrarea microbiologică a probelor prin: preîmbogățirea neselectivă, izolarea selectivă a tulpinilor de *E. coli* prezumtiv ESBL/AmpC (detecția ESBL/AmpC), încadrarea taxonomică a tulpinilor izolate în urma detecției ESBL și confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* identificate ca fiind producătoare de ESBL/AmpC;
- caracterizarea rezistenței la antibioticele non-betalactamice pentru izolatele de *E. coli* prezumtiv producătoare ESBL/AmpC;
- detecția tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele responsabile de codificarea enzimelor ESBL;
- încadrarea tulpinilor de *E. coli* în grupuri filogenetice;
- caracterizarea din punct de vedere molecular a tulpinilor de *E. coli* izolate în urma screening-ului ESBL, în vederea identificării principalelor gene ce codifică enzimele betalactamază cu spectru extins.

CAPITOLUL VI. DETECȚIA TULPINILOR DE *E. COLI* PRODUCĂTOARE DE ESBL IZOLATE DE LA PORCINE ȘI OM

CHAPTER VI. DETECTION OF ESBL PRODUCING *E. COLI* STRAINS ISOLATED FROM PIGS AND HUMANS

Izolarea tulpinilor de *Escherichia coli* (*E. coli*) sintetizatoare de enzime beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) reprezintă o problemă de sănătate publică. Mai mult, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) recunoaște și clasifică aceste tulpini drept agenți patogeni cu prioritate critică (OMS, 2014).

În plus, enzimele ESBL pot fi însoțite de prezența enzimelor AmpC, care au o prevalență în creștere (Conceição-Neto ș.a., 2017). Apariția și prevalența ridicată a enzimelor ESBL este asociată cu utilizarea excesivă de antimicrobiene (AM), (Liebana ș.a., 2006), precum și cu utilizarea necorespunzătoare a cefalosporinelor la animalele de producție (Liebana ș.a., 2013).

Transmiterea genelor care codifică enzimele ESBL transferabile de la animale la oameni poate fi realizată fie prin alimente contaminate, fie prin contact direct (Dohmen ș.a., 2015; Kola ș.a., 2012). Câteva studii au semnalat prezența *E. coli* sintetizatoare ESBL, pe de o parte la animalele de producție, în special la porci, păsări de curte libere și bovine iar pe de altă parte în produsele alimentare din întreaga lume.

6.1 Material și metoda de lucru

6.1.1 Recoltarea probelor

La probele selectate și luate în studiu s-au urmărit factorii de risc epidemiologic pentru transmiterea *E. coli* ESBL. De asemenea, criteriile de includere au fost reprezentate de vârsta suinelor (să nu depășească 3-8 luni), greutatea (medii spre mari) și să nu fi fost tratate cu antibiotice în decursul vieții. Probele analizate au fost recoltate de la suine sacrificate în trei abatoare din județele Iași, Botoșani și Suceava și de la persoanele care lucrau în fermele de proveniență a porcinelor, pe parcursul anilor 2016-2018 (fig.6.1) (tabelul 6.1). Au fost recoltate în total 200 probe de conținut cecal de la porci sacrificați, cu vârsta cuprinsă între 3 și 8 luni, precum și 32 probe coprologice de la personalul auxiliar (îngrijitori, medici veterinari) cu respectarea condițiilor obligatorii de recoltare sterilă. Criteriile de includere pentru personalul inclus în studiu au fost reprezentate de starea de sănătate, administrarea anterioară de cefalosporine, expunerea la contactul cu animalele, manipularea antibioticelor pentru porci și ocupația anterioară.

Probele au fost prelevate aleatoriu din loturile de sacrificare luate în studiu, în

pungi sterile, intacte, fără a fi expuse la temperaturi extreme, apoi transportate și prelucrate bacteriologic, în timpul cel mai scurt (maxim 48 ore de la prelevare). Colectarea probelor de origine umană s-a realizat cu acordul personalului, respectând regulile de etică, în paralel cu recoltarea probelor de cecum din unitățile de abatorizare.



Fig. 6.1 Identificarea zonelor de recoltare a probelor

Fig. 6.1 Identification of the sample collection areas

Pe parcursul celor trei ani de studiu (2016-2018) au fost recoltate și analizate 200 probe din 3 unități de abatorizare: Iași, 68 probe de cecumuri, Botoșani, 87 probe și Suceava 45 probe cecale de la suinele abatorizate.

Probele de origine umană au fost recoltate după cum urmează: 12 probe din ferma Iași, 10 probe din ferma Botoșani și 10 probe din ferma Suceava.

Tabelul 6.1/Table 6.1

Proveniența și numărul de probe recoltate
Origin and number of samples collected

Sursa probelor	Anul 2016 Nr. probe	Anul 2017 Nr. probe	Anul 2018 Nr. probe	Total probe recoltate
Abator Iași	22	16	30	68
Abator Botoșani	32	25	30	87
Abator Suceava	23	10	12	45
Total probe conținut cecal/an	77	51	72	200
Probe origine umană	12	10	10	32

6.1.2 Detecția tulpinilor de *E. coli* ESBL/AmpC

Izolarea tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC din probele de conținut cecal suin s-a realizat conform protocolului de lucru al Laboratorului de Referință al Uniunii Europene pentru Rezistența Antimicrobiană (EURL-AR) (fig. 6.7). Probele

recoltate au fost procesate în maxim 48 de ore de la recoltare în Laboratorul de Bacteriologie din cadrul LSVSA Iași.

Protocolul de lucru pentru probele de cecumuri și coproculturi a urmărit, într-o primă etapă, deschiderea aseptică a cecumului (fig. 6.2), preluarea conținutului cu o pipetă și cântărirea a $1 \pm 0,1$ g de probă într-un tub Falcon de 50 ml, steril (fig. 6.3, fig. 6.4).

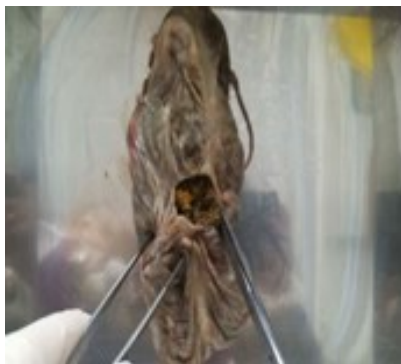


Fig. 6.2 Deschiderea aseptică a cecumului (*original*)
Fig. 6.2 Aseptic opening of the blind (*original*)



Fig. 6.3 Recoltarea de conținut cecal (*original*)
Fig. 6.3 Harvesting of cecal content (*original*)

Ulterior, a urmat etapa de preîmbogățire, utilizând 9 ml de apă peptonată tamponată (APT) (Oxoid, Basingstoke, Marea Britanie) adăugată peste proba de conținut cecal (fig. 6.5). Tuburile se incubează cu dopurile ușor desfiletate, în condiții de aerobioză la $37 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de 20 ± 2 ore.

Strategia de bază pentru a detecta producătorii ESBL/AmpC este de a folosi drept indicator o cefalosporină (în cazul nostru cefotaxima) pentru tulpinile de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare de ESBL/AmpC, apoi să se observe sinergii între cefalosporine/acid clavulanic, care să distingă producătorii ESBL sau ESBL/AmpC de tulpinile AmpC-hiperproducătoare.

Cefalosporina ideală pentru a fi utilizată drept indicator este una la care toate tipurile de ESBL conferă rezistență chiar și atunci când producția lor este redusă. Prin urmare, după etapa de preîmbogățire, s-a realizat detecția ESBL/AmpC utilizând mediul selectiv MacConkey (MC) (Oxoid, Basingstoke, Marea Britanie), suplimentat cu cefotaxime (CTX) (Sigma-Aldrich) și s-a incubat peste noapte la 44°C . Din plăcile de agar, au fost selectate trei colonii lactozo pozitive, de organisme producătoare de cefalosporinază și s-au dispersat din nou pe MacConkey suplimentat cu cefotaxim (CTX) (Sigma-Aldrich), apoi s-au incubat la $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pentru 18-22 ore. Ulterior, se alege una dintre aceste colonii de *E. coli* pentru confirmarea speciei prin testele biochimice MIU (mobilitate, indol, uree)/TSI (glucoză, lactoză, hidrogen sulfurat, gaz) (Oxoid, Basingstoke, UK)(fig. 6.6).

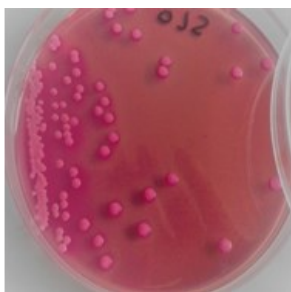
Fig. 6.4 Cântărirea conținutului cecal (*original*)Fig. 6.4 Weighing of the cecal content (*original*)Fig. 6.5 Adăugare apă peptonată (*original*)Fig. 6.5 Adding peptoned water (*original*)

Fig. 6.6 Colonii de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare de ESBL pe agar MacConkey (MC) (Oxoid, Basingstoke, Marea Britanie) suplimentat cu cefotaxim (CTX) (Sigma-Aldrich) și confirmarea prin testele MIU/TSI (Oxoid, Basingstoke, UK) a izolatelor de *E. coli* (*original*).

Fig. 6.6 *E. coli* colonies presumably producing ESBL on MacConkey (MC) agar supplemented with cefotaxim (CTX) and confirmation by MIU/TSI tests of *E. coli* isolates (*original*)

Protocolul de lucru pentru probele de fecale umane a fost același ca și în cazul probelor cecale prelevate de la porci, analizate în maxim 24 de ore de la recoltare.

Coloniile care au prezentat morfologia tipică pentru *E. coli* prezumtiv sintetizatoare de ESBL/AmpC pe mediul MacConkey (MC) (Oxoid, Basingstoke, UK) suplimentat cu cefotaxim (fig. 6.6), au fost confirmate pe baza proprietăților biochimice, utilizând testul TSI (tri-sugar-iron agar), testul MIU (mobilitate-indol-uree), (Oxoid, Basingstoke, UK) (fig. 6.6), testul ONPG, (O-nitrophenyl- β -D-galacto-pyranoside) iar pentru tulpinile atipice, izolatele indol negative și cele care nu fermentează lactoza, sunt identificate suplimentar cu teste Api 20E (bioMérieux).

După etapa de detecție a ESBL, s-a realizat confirmarea fenotipică a izolatelor obținute ca ESBL/AmpC pe baza sinergiei dintre o cefalosporină și cefalosporina potențată cu acid clavulanic.

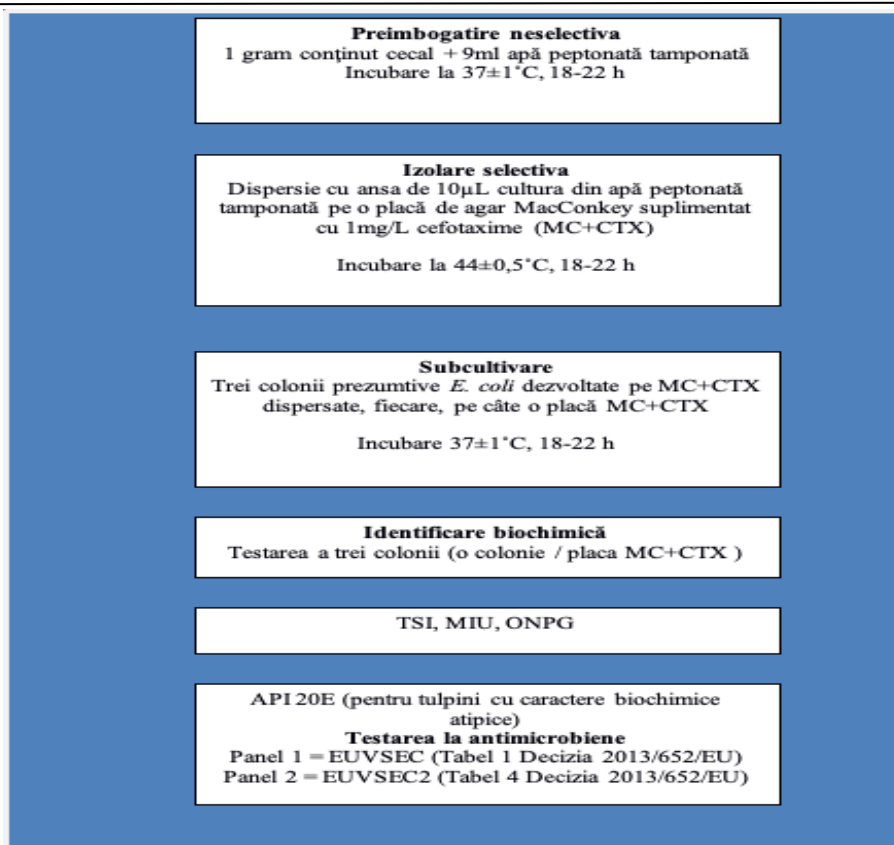


Fig. 6.7 Reprezentarea schematică a protocolului de lucru utilizat pentru detecția ESBL și încadrarea taxonomică a izolatelor obținute (EURL-AR)

Fig. 6.7 Schematic representation of the working protocol used for ESBL screening and taxonomic classification of the isolates obtained (EURL-AR)

6.1.3. Confirmarea fenotipică a izolatelor prezumtiv producătoare de enzime ESBL

Pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins s-au folosit metoda microdiluției în bulion și rezultatele testelor de sinergie dintre acid clavulanic și ceftazidim și/sau a acidului clavulanic și cefotaxim.

De asemenea, conform literaturii de specialitate, detecția fenotipică a tulpinilor producătoare de beta-lactamaze de tip AmpC se poate realiza prin intermediul unei cefalosporine AmpC stabilă, așa cum este cefepima.

Pentru o interpretare corectă a rezultatelor, este esențială identificarea în cultură pură a speciei bacteriene și o bună cunoaștere a valorilor concentrației minime inhibitorii (MIC) pentru antibioticele utilizate la detecția ESBL/AmpC.

Valorile concentrației minime inhibitorii (MIC) obținute au fost interpretate conform valorilor limită epidemiologice ale Comitetului European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (eucast.org), conform criteriilor stabilite prin Decizia 2013/652/UE, precum și conform criteriilor EFSA privind fenotipul prezumtiv ESBL/AmpC.

Concentrațiile minime inhibitorii (MIC) (mg/l) au fost determinate utilizând plăci Sensititre (TrekDiagnostic System), respectiv panouri EUVSEC ce conțin următoarele antibiotice: ampicilină (AMP), timocielin (TEM), cefotaxim (CTX), ceftazidim (CAZ), gentamicină (GEN), sulfametoxazol (SMX), trimetoprim (TMP), ciprofloxacina (CIP), acid nalidixic (NAL), cloramfenicol (CHL), azitromicină (AZI), tigeciclină (TGC), colistină (COL) și meropenem (MERO) (fig. 6.8).

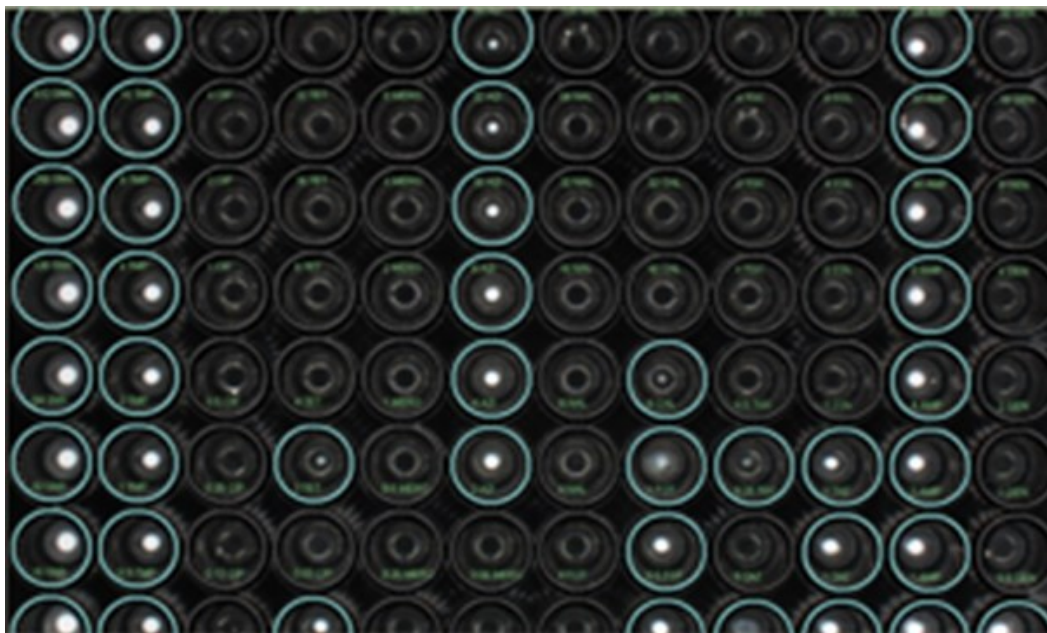


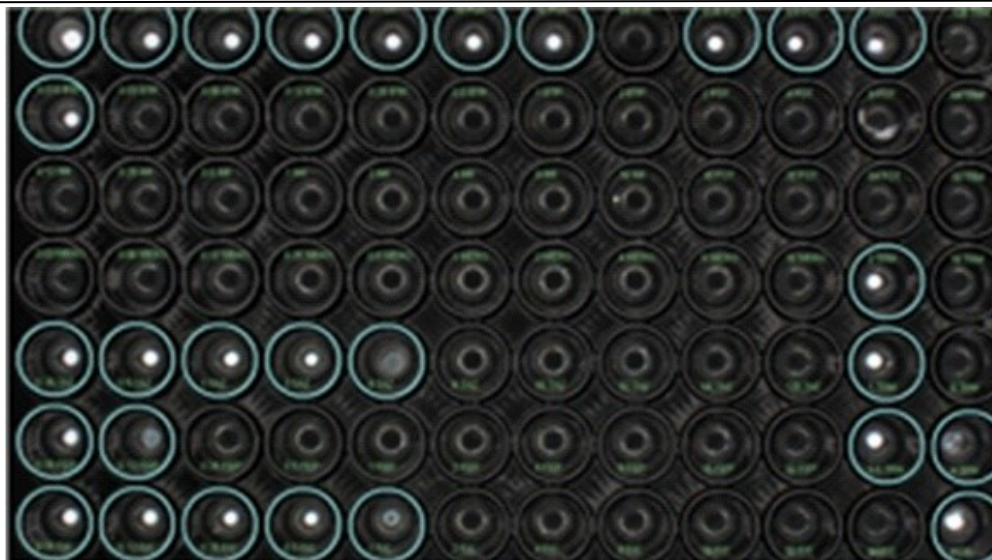
Fig. 6.8 Placa EUVSEC, panel 1 de antibiotice (*original*)

Fig. 6.8 EUVSEC plaque, panel 1 of antibiotics (*original*)

Izolatele de *E. coli* beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) obținute în urma detecției, după ce au fost testat grupul de antimicrobiene menționate anterior și care s-au dovedit a fi rezistente la cefotaxim și/sau ceftazidim și/sau meropenem, au fost testate ulterior cu un al doilea panel antimicrobian, respectiv EUVSEC2 (fig. 6.9). Acest panel include testul de sinergie cefoxitin (FOX), cefepime (FEP) și clavulanat în combinație cu cefotaxim (CTX) și ceftazidim (TAZ) pentru detecția producției de enzime beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) și AmpC.

În plus, al doilea panou conține temocilin (TEM), imipenem (IMI), meropenem (MERO) și ertapenem (ETP) necesare verificării fenotipice a tulpinilor prezumtiv producătoare de carbapenemază.

Pentru anumite antibiotice incluse în panoul de antibiotice EUVSEC2, cum ar fi cefotaxim și ceftazidim, s-a realizat testarea și în panoul suplimentar deoarece, deși majoritatea ESBL conferă rezistență ambilor compuși, unele enzime ESBL conferă în primul rând rezistență doar la unul dintre compuși.

Fig. 6.9. Placa EUVSEC, panel 2 de antibiotice (*original*)Fig. 6.9. EUVSEC plaque, panel 2 of antibiotics (*original*)

De asemenea, a fost prevăzută testarea sinergiei de confirmare, astfel încât să se poată identifica fenotipul ESBL. Cefoxitin a fost de asemenea inclus în vederea identificării fenotipului AmpC. Antibioticele, meropenem, imipenem și ertapenem au fost incluse pentru a identifica presupușii producători de carbapenemază. Eficacitatea temocilinei (6-ametoxi-ticarcillin) nu este afectată de majoritatea enzimelor ESBL și AmpC și această substanță poate fi utilă în special în medicina umană pentru a trata infecțiile tractului urinar cauzate de organismele gram-negative producătoare de ESBL (Oteo, 2008; Livermore și Tulkens, 2009). Susceptibilitatea la temocilină permite o caracterizare fenotipică suplimentară a carbapenemazelor. Din rezultatele unor astfel de teste suplimentare este posibil să se deducă clasa prezumtivă de enzime beta-lactamaze care sunt responsabile pentru conferirea profilului fenotipic al rezistenței la cefalosporinele de generația a treia sau la meropenem, furnizând informații epidemiologice suplimentare.

Protocolul de lucru pentru testarea rezistenței la alte clase de antibiotice non-betalactamice și confirmarea fenotipică a tulpinilor prezumtiv producătoare de ESBL, utilizând cele două plăcuțe EUVSEC, a urmărit:

- a) **Pregătirea culturii bacteriene:** din tulpina bacteriană identificată se efectuează culturi pure pe un mediu solid neselectiv (Columbia, suplimentat cu 5% sânge defibrinat berbec) și se incubează la $37 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 18-24 ore în aerobioză.
- b) **Pregătirea suspensiei inițiale:** se prelevează cu o ansă sterilă colonii izolate și se suspendă într-un tub cu 4-5 ml de apă demineralizată și purificată sterilă. Se omogenizează bine prin răsturnare repetată de 8-10 ori a flaconului sau prin utilizarea unui mixer de tip vortex. Suspensia trebuie să aibă o concentrație de aproximativ 0,5 McFarland ($1,5 \times 10.000.000$ ufc/ml).
- c) **Pregătirea inoculului:** se introduce o pipetă monocanal calibrată, setată la volumul de 10 μ l, cu vârful la o adâncime de cca 1 cm în suspensia de apă deminerali-

zată și se preumple vârful pipetei de 1-3 ori înainte de a prelua inoculul. Se preia un inocul de 10 μ l din apa demineralizată, prin eliberarea lentă a butonului pipetei, apoi se așteaptă 1-2 secunde și se retrage vârful din lichid atingându-l de peretele tubului pentru a îndepărta excesul de lichid. Cei 10 μ l din apa demineralizată se inoculează într-un tub cu 11 ml de bulion Muller-Hinton ajustat cationic cu tampon TES (CAMHB). Se omogenizează bine prin răsturnarea repetată de minim 8-10 ori a flaconului.

- d) **Inocularea plăcii de microtitrare**, se face cu ajutorul inoculatorului automat cu primul set de antimicrobiene, placa EUVSEC1. În cazul în care, pe placa EUVSEC1, s-a constatat rezistența la cefotaximă sau la ceftazidimă sau la meropenem pe baza criteriilor de interpretare (valori-limită epidemiologice) (tabelul 6.2) s-a efectuat testarea la antimicrobiene cu al doilea set de antimicrobiene, placa EUVSEC2.
- e) După inocularea plăcilor EUVSEC și EUVSEC 2 cu ajutorul inoculatorului automat, plăcile sunt introduse în incubator la 35-37 °C, 18-24 ore. După trecerea timpului de incubare, plăcile sunt introduse în sertarul aparatului Biomic (fig. 6.10) pentru citirea rezultatelor (tabelul 6.3).

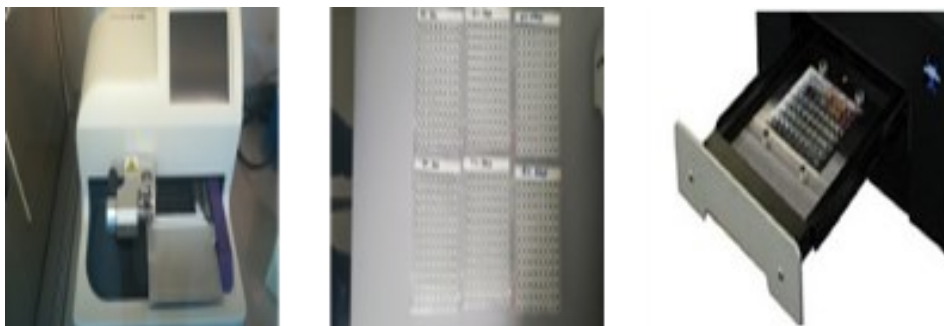


Fig. 6.10 Inoculator automat, plăcile EUVSEC inoculate și aparatul Biomic utilizat pentru citirea MIC
Fig. 6.10. Automatic inoculator, inoculated EUVSEC plates and Biomic device used for MIC reading

Interpretarea rezultatelor privind confirmarea fenotipului (ESBL; ESBL/AmpC; AmpC) izolatelor de *E. coli* s-a realizat în conformitate cu recomandările EFSA, astfel:

- fenotipul ESBL se caracterizează prin sinergismul pozitiv dintre cefalosporină (cefotaxim și/sau ceftazidim) și cefalosporina potențată cu acid clavulanic, cu sensibilitate la cefoxitin;
- fenotipul ESBL/AmpC se caracterizează prin sinergismul dintre cefalosporină (cefotaxim sau ceftazidim) și cefalosporina potențată cu acid clavulanic și rezistență la cefoxitin;
- fenotipul AmpC se caracterizează prin sinergie negativă dintre cefalosporină (cefotaxim și/sau ceftazidim) și cefalosporina potențată cu acid clavulanic, rezistență la cefoxitin.

Prezența doar a fenotipului AmpC în cadrul unui izolat nu exclude complet lipsa enzimelor ESBL, deoarece de multe ori fenotipul AmpC ascunde din punct de vedere fenotipic prezența enzimelor ESBL.

Pentru identificarea definitivă a beta-lactamazelor cu spectru extins și a enzimelor de tip AmpC se impune testarea prin tehnici de biologie moleculară, de amplificare și secvențiere a genelor implicate în sinteza acestor enzime.

Tabelul 6.2/Table 6.2

Set de substanțe antimicrobiene care trebuie incluse în monitorizarea RAM, pragurile EUCAST care indică rezistență și intervalele de concentrație testate în cazul *Salmonella* spp. și *E. coli* indicator comensal (primul set) decizia 652/2013

Set of antimicrobial substances to be included in RAM monitoring, EUCAST thresholds indicating resistance and concentration ranges tested for *Salmonella* spp. and *E. coli* commensal indicator (first set) decizia 652/2013

Antimicrobian	Specie	Praguri de interpretare a RAM (mg/l)		Intervale de concentrații (mg/l) (Numărul de godeuri între paranteze)
		ECOFF (a)	Valoare care indică rezistența clinică (b)	
Ampicilină	<i>Salmonella</i>	> 8	> 8	1-64 (7)
	<i>E. coli</i>	> 8	> 8	
Cefotaximă	<i>Salmonella</i>	> 0,5	> 2	0,25-4 (5)
	<i>E. coli</i>	> 0,25	> 2	
Ceftazidimă	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0,5-8 (5)
	<i>E. coli</i>	> 0,5	> 4	
Meropenem	<i>Salmonella</i>	> 0,125	> 8	0,03-16 (10)
	<i>E. coli</i>	> 0,125	> 8	
Acid nalidixic	<i>Salmonella</i>	> 16	NA	4-128 (6)
	<i>E. coli</i>	> 16	NA	
Ciprofloxacin	<i>Salmonella</i>	> 0,064	> 1	0,015-8 (10)
	<i>E. coli</i>	> 0,064	> 1	
Tetraciclina	<i>Salmonella</i>	> 8	NA	2-64 (6)
	<i>E. coli</i>	> 8	NA	
Colistin	<i>Salmonella</i>	> 2	> 2	1-16 (5)
	<i>E. coli</i>	> 2	> 2	
Gentamicină	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0,5-32 (7)
	<i>E. coli</i>	> 2	> 4	
Trimetoprim	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0,25-32 (8)
	<i>E. coli</i>	> 2	> 4	
Sulfametoxazol	<i>Salmonella</i>	NA	NA	8-1 024 (8)
	<i>E. coli</i>	> 64	NA	
Cloramfenicol	<i>Salmonella</i>	> 16	> 8	8-128 (5)
	<i>E. coli</i>	> 16	> 8	

Antimicrobian	Specie	Praguri de interpretare a RAM (mg/l)		Intervale de concentrații (mg/l) (Numărul de godeuri între paranteze)
		ECOFF (a)	Valoare care indică rezistența clinică (b)	
Azitromicină	<i>Salmonella</i>	NA	NA	2-64 (6)
	<i>E. coli</i>	NA	NA	
Tigeciclină	<i>Salmonella</i>	> 1 (*)	> 2 (*)	0,25-8 (6)
	<i>E. coli</i>	> 1	> 2	

(a) Valori-limită epidemiologice EUCAST.

(b) Valori EUCAST care indică rezistența clinică.

(*) Date EUCAST disponibile pentru *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium*, *Typhi* și *Paratyphi*. NA: nu este disponibil.

Tabelul 6.3/ Table 6.3

Set de substanțe antimicrobiene, valorile-limită epidemiologice EUCAST (ECOFF) și valorile care indică rezistență clinică, precum și intervalele de concentrație care trebuie utilizate doar pentru testarea izolatelor de *Salmonella spp.* și *E. coli* indicator comensal rezistente la cefotaximă sau ceftazidimă sau meropenem – (al doilea set) Decizia 652/2013/UE

Set of antimicrobial substances, EUCAST epidemiological limit values (ECOFF) and clinical resistance values, as well as the concentration ranges to be used only for testing Salmonella spp. and E. coli isolates commensal indicator sheets resistant to cefotaxime or ceftazidime or meropenem - (second set) Decizia 652/2013/UE

Antimicrobian	Specie	Praguri de interpretare a RAM (mg/l)		Intervale de concentrații (mg/l) (Numărul de godeuri între paranteze)
		ECOFF (a)	Valoare care indică rezistență clinică (b)	
Cefoxitină	<i>Salmonella</i>	> 8	NA	0,5-64 (8)
	<i>E. coli</i>	> 8	NA	
Cefepimă	<i>Salmonella</i>	NA	NA	0,06-32 (10)
	<i>E. coli</i>	> 0,125	> 4	
Cefotaximă + acid clavulanic (*)	<i>Salmonella</i>	NA (**)	NA (**)	0,06-64 (11)
	<i>E. coli</i>	NA (**)	NA (**)	
Cefotaximă + acid clavulanic (*)	<i>Salmonella</i>	NA (**)	NA (**)	0,125-128(11)
	<i>E. coli</i>	NA (**)	NA (**)	
Meropenem	<i>Salmonella</i>	> 0,125	> 8	0,03-16 (10)
	<i>E. coli</i>	> 0,125	> 8	
Temocilină	<i>Salmonella</i>	NA	NA	0,5-64 (8)
	<i>E. coli</i>	NA	NA	
Imipenem	<i>Salmonella</i>	> 1	> 8	0,12-16 (8)
	<i>E. coli</i>	> 0,5	> 8	
Ertapenem	<i>Salmonella</i>	> 0,06	> 1	0,015-2 (8)
	<i>E. coli</i>	> 0,06	> 1	

Antimicrobian	Specie	Praguri de interpretare a RAM (mg/l)		Intervale de concentrații (mg/l) (Numărul de godeuri între paranteze)
		ECOFF (a)	Valoare care indică rezistență clinică (b)	
Cefotaximă	<i>Salmonella</i>	> 0,5	> 2	0,25-64 (9)
	<i>E. coli</i>	> 0,25	> 2	
Ceftazidimă	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0,25-128 (10)
	<i>E. coli</i>	> 0,5	> 4	

(a) Valori-limită epidemiologice EUCAST.

(b) Valori EUCAST care indică rezistență clinică. NA: nu este disponibil.

(*) 4 mg/l acid clavulanic.

(**) Valorile se compară cu valorile pentru cefotaximă și ceftazidimă și se interpretează conform orientărilor CLSI sau EUCAST privind testele de sinergie.

6.1.4. Determinarea paternului de rezistență la alte clase de antibiotice a tulpinilor prezumtiv sintetizatoare ESBL

Tulpinile de *E. coli* sintetizatoare de beta-lactamaze (ESBL), izolate din produsele alimentare, sunt mult mai reduse față de cele transmise de la animalele de fermă la om. Există o diseminare limitată a genelor ESBL sau AmpC plasmidice la oameni sănătoși sau la pacienți prin transferul orizontal de gene (Borjesson ș.a., 2016).

Cu toate acestea, apariția *E. coli* producătoare de ESBL și/sau AmpC în flora intestinală a animalelor nu este de dorit, dar riscul transmiterii orizontale a genelor de rezistență în populația umană ar trebui luat în considerare. În mod clar, epidemiologia tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare ESBL și/sau AmpC izolate de la animale, din alimente sau de la oameni este complexă, iar monitorizarea ei aduce o contribuție semnificativă la datele disponibile.

Determinarea paternului de rezistență s-a realizat pe baza antibiogramelor de tip concentrație minimă inhibitorie (CMI), utilizând practic rezultatele obținute la testările cu cele două plăcuțe EUVSEC și EUVSEC2.

6.2. Rezultate și discuții

Acest studiu oferă informații utile asupra epidemiologiei *E. coli* prezumtiv producătoare de ESBL/AmpC în fermele de porci. Timp de trei ani consecutivi, 2016, 2017 și 2018, au fost examinate un total de 200 de probe de conținut cecal recoltat de la suine abatorizate, cu vârsta cuprinsă între 3 și 8 luni. De asemenea, au mai fost examinate și 32 de probe coprologice recoltate de la personalul auxiliar și îngrijitori. Prin urmare, au fost preluate un total de 232 de probe de origine animală și umană.

În urma detecției ESBL efectuată în perioada 2016-2018, din totalul de 232 de probe prelucrate au fost izolate 123 (53.02%) de tulpini de *E. coli* prezumtiv ESBL de origine animală și umană (fig. 6.11).

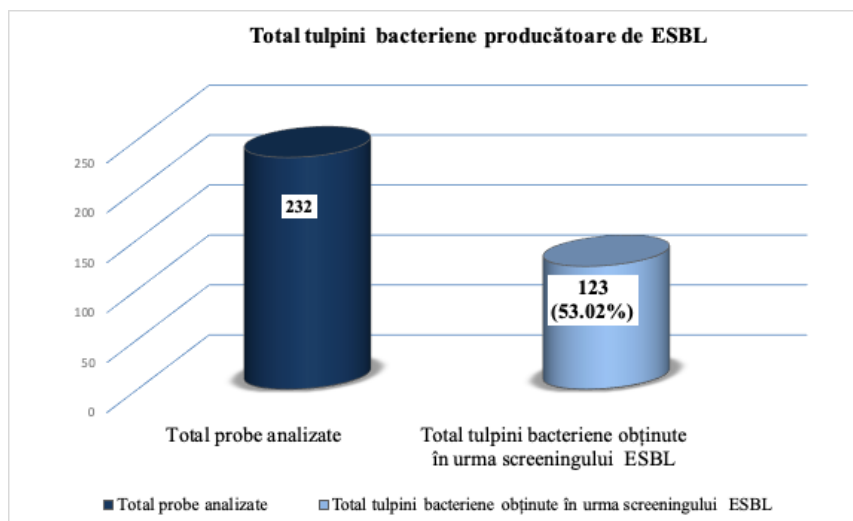


Fig. 6.11 Total tulpini prezumtiv producătoare de ESBL

Fig. 6.11 Total presumptive strains producing ESBL

Raportarea rezultatelor detectate, în funcție de originea probelor recoltate, a pus în evidență următoarele:

- din probele de conținut cecal prelucrate (n=200) au fost obținute 118 (59%) tulpini de *E. coli* prezumtiv ESBL (fig.6.12);
- în ceea ce privește cultivarea probelor inițiale de origine umană (n=32) pe mediul Mac-Conkey suplimentat cu cefotaxim (CTX), s-au izolat 5 (15.63%) tulpini de *E. coli* prezumtiv producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) (tabelul 6.4; fig. 6.13).

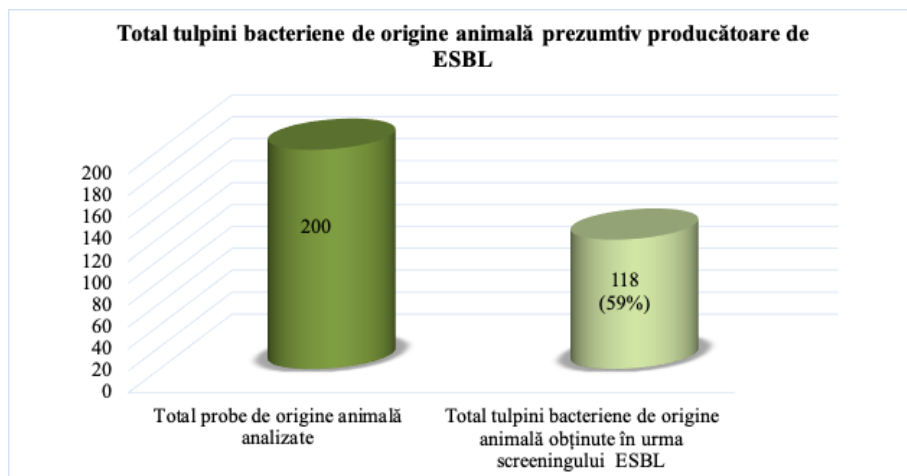


Fig. 6.12 Total tulpini de origine animală prezumtiv producătoare de ESBL

Fig. 6.12 Total strains of animal origin presumably producing ESBL

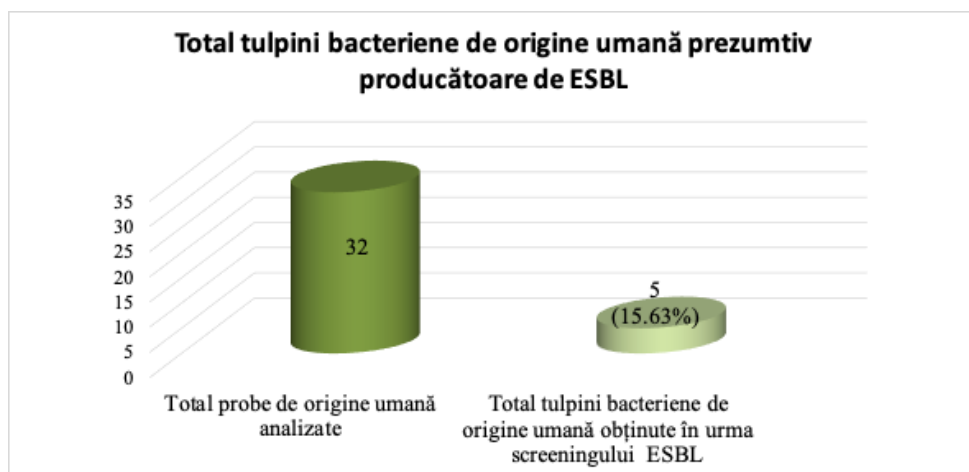


Fig. 6.13 Total tulpini de origine umană prezumtiv producătoare de ESBL

Fig. 6.13 Total strains of presumed human origin producing ESBL

De asemenea, analiza rezultatelor obținute ca urmare a testării probelor de origine animală pentru toată perioada luată în calcul, în funcție de județul de unde au fost recoltate, a evidențiat că procentul de tulpini *E. coli* prezumtiv producătoare de ESBL este cuprins între 51-70, după cum urmează: pentru Botoșani, 51.72% (45/87), pentru Suceava, 55.56% (25/45), iar pentru Iași 70.59% (48/68) (tabelul 6.4). Pentru probele de origine umană, din cele 5 tulpini de *E. coli* sintetizatoare de ESBL/AmpC izolate, 2 au provenit de la îngrijitorii din județul Iași și 3 de la personalul auxiliar din Botoșani.

Tabelul 6.4/Table 6.4

Centralizarea rezultate obținute în urma detecției ESBL/AmpC la abatoarele din Iași, Botoșani și

Suceava în perioada 2016-2018

Centralization of ESBL / AmpC screening results at slaughter houses in Iasi, Botoșani and Suceava during 2016-2018

Sursa probelor	Anul 2016		Anul 2017		Anul 2018		Total tulpini 2016+2017+2018	
	Nr. Probe (n)	Nr. izolate <i>E. coli</i> (MC+CTX) *	Nr. Probe (n)	Nr. izolate <i>E. coli</i> (MC+CTX) *	Nr. Probe (n)	Nr. izolate <i>E. coli</i> (MC+CTX) *	Nr. Probe (n)	Nr. izolate <i>E. coli</i> (MC+CTX) *
Abator IȘ*	21	3	16	16	31	29	68	48
Abator BT*	35	20	23	13	29	12	87	45
Abator SV*	21	3	12	10	12	12	45	25
Total tulpini <i>E. coli</i> de origine animală	77	26	51	39	72	53	200	118
Total tulpini <i>E. coli</i> de origine umană	12	2	10	3	10	0	32	5

*IȘ- Iași; BT- Botoșani; SV- Suceava; MC+CTX- MacConkey suplimentat cu cefotaxim (CTX)

Confirmarea fenotipică a tulpinilor prezumtiv producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) s-a realizat prin testul de sinergie între cefotaxim și/sau ceftazidim și aceleași cefalosporine potențate cu acid clavulanic. Pentru izolatele de *E. coli* ESBL/AmpC, împreună cu testul de sinergie, descris anterior, s-a evaluat și rezistența la cefoxitin (FOX) și cefepim (FEP).

Tabelul 6.5/ Table 6.5

Fenotipurile confirmate la izolatele de *E. coli* cultivate pe mediul MC+CTX*
Phenotypes confirmed in *E. coli* isolates cultivated on MC + CTX* medium

Sursa tulpinilor de <i>E. coli</i> izolate pe MC+CTX*	Nr. Tulpini izolate pe MC+CTX*	Fenotip		
		Nr. tulpini <i>E. coli</i> fenotip ESBL (2016 +2017+2018)	Nr. tulpini <i>E. coli</i> fenotip ESBL+AmpC (2016+2017+2018)	Nr. tulpini <i>E. coli</i> fenotip AmpC (2016+2017+2018)
Total tulpini <i>E. coli</i> de origine animală	118	77	5	36
Total Tulpini <i>E. coli</i> de origine umană	5	3	1	1

*MC+CTX- MacConkey suplimentat cu cefotaxim (CTX)

Rezultatele obținute sunt sintetizate în tabelul 6.5 și au confirmat fenotipic că 100 % din izolatele de *E. coli* identificate în urma detecției sunt prezumtiv producătoare de ESBL și/sau AmpC. Centralizarea rezultatelor la testul de sinergie realizat cu cea de a doua placă EUVSEC2 a generat următorul set de date: din cele 118 izolate de *E. coli* de origine animală obținute în urma screening-ului ESBL/AmpC, majoritatea au prezentat fenotip ESBL, 77/118 (65.25%), ESBL+AmpC, 5/118 (4.23%) și 36/118 (30.50%) au prezentat fenotip AmpC (tabelul 6.5; fig. 6.14).

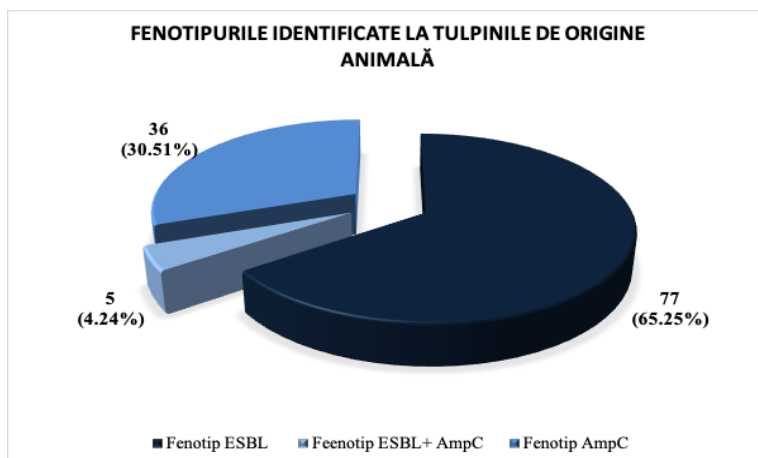


Fig.6.14 Fenotipuri confirmate la izolatele de *E. coli* de origine animală izolate pe mediul MC+CTX
Fig. 6.14 Phenotypes confirmed in *E. coli* isolates of animal origin isolated on MC + CTX medium

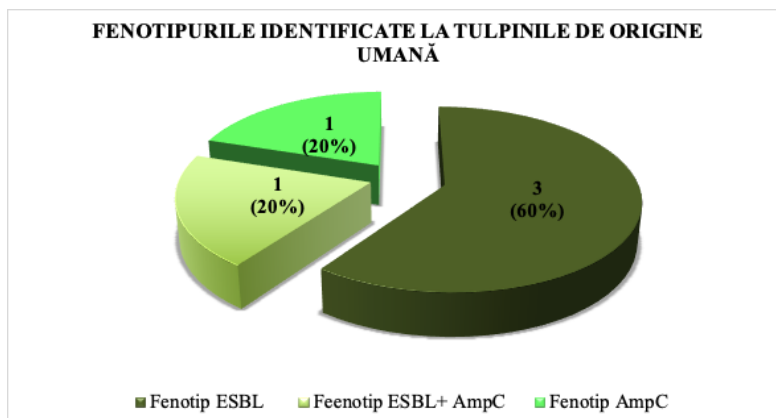


Fig. 6.15 Fenotipuri identificate la tulpinile de *E. coli* de origine umană izolate pe mediul MC+CTX

Fig. 6.15 Phenotypes identified in *E. coli* strains of human origin isolated on MC + CTX medium

Pentru cele 5 izolate de origine umană obținute în urma detecției ESBL/AmpC, majoritar a fost fenotipul ESBL 3/5 (60%), urmat de fenotipul ESBL+AmpC 1/5 (20%) și AmpC 1/5 (20%).(tabelul 6.5; fig. 6.15).

Toate tulpinile (n=123), atât de origine animală cât și umană, izolate în urma detecției ESBL/AmpC au fost confirmate fenotipic ca fiind prezumtiv producătoare de ESBL/AmpC.

Pentru porcine, portajul fecal cu tulpini de *E. coli* producătoare de enzime ESBL prezintă diferențe geografice mari, cu proporții ce variază între 15,2% în Elveția (probe cecale) și 23,4% în Marea Britanie (probe cecale) sau 49% în Portugalia (probe fecale) (Geser ș.a., 2011; Ramos ș.a., 2013; Randall ș.a., 2014).

Pentru anul 2015, conform Centrului European de Prevenire și Control al Bolilor (ECDC/EFSA/EMA, 2017), în România procentul de izolate *E. coli* ESBL a fost de 46,6 - peste media europeană, de 31,9%. Cea mai mare prevalență a fost înregistrată în Spania, de 81,5% iar la polul opus se situează Finlanda, cu un procent de doar 0,3 %.

Prevalența tulpinilor de *E. coli* sintetizatoare de AmpC în România, prezintă, un trend ascendent, de 11,5% față de media europeană, care este de 9,7%. (efsa.europa.eu).

În Belgia, studiul realizat de Van Damme ș.a. (2017), a pus în evidență prezența tulpinilor de *E. coli* ESBL/AmpC pozitive în 75% din probele de fecale și în 47% din probele de amigdale recoltate la sacrificarea porcilor.

În tabelul 6.6, fenotipul predominant atât pentru tulpinile de origine animală, cât și pentru cele de origine umană, este de tip ESBL iar prevalența obținută se încadrează în intervalele menționate anterior în alte studii realizate în Europa.

De asemenea, diferențele mari dintre zone din Europa pot fi justificate prin politica fiecărei țări privind administrarea antibioticelor la animalele de rentă. În unele țări, precum Olanda, în urma prevalențelor crescute înregistrate, începând din ianuarie 2013, veterinarilor au fost obligați din punct de vedere legal să limiteze utilizarea cefalosporinelor de

generația a treia și a patra și a fluoroquinolonelor doar în infecții confirmate prin examene bacteriologice și teste de susceptibilitate (Sda, 2013).

Ținând cont că porcii, și ulterior carnea de porc, contribuie la răspândirea zoonotică a tulpinilor de *E. coli* ESBL/AmpC (Carmo ș.a., 2014; Evers ș.a., 2017; Lazarus ș.a., 2015), aceste tulpini de ESBL/AmpC pot fi izolate din tractul gastrointestinal uman timp de până la 5 ani (Brolund, 2014), astfel sunt necesare strategii de intervenție pentru a reduce prezența acestor izolate pe carcassele de porci și pentru a reduce expunerea oamenilor la tulpinile de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC.

Testarea sensibilității la alte antibiotice beta-lactamice și non-beta-lactamice s-a realizat pentru întreaga colecție bacteriană (n=123 de izolate de *E. coli*) confirmată fenotipic ca fiind ESBL/AmpC.

Valorile concentrației minime inhibitorii (CMI) obținute în urma realizării antibiogramelor au fost interpretate conform valorilor limită epidemiologice ale Comitetului European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (eucast.org), conform criteriilor stabilite prin Decizia 2013/652 / UE.

Monitorizarea și caracterizarea fenotipică a rezistenței la antibioticele non-beta-lactamice și beta-lactamice a izolatelor prezumtiv sintetizatoare de ESBL și/sau AmpC, furnizează informații epidemiologice utile asupra rezervoarelor diferitelor patenuri de rezistență ale sușelor de *E. coli* ESBL/AmpC prezente la animale de rentă și îngrijitori.

În tabelul 6.6, sunt sintetizate rezultatele referitoare la numărul de tulpini ce au fost considerate rezistente/sensibile la diverse categorii antimicrobiene: Peniciline (Beta-lactamine), Carbapeneme (Beta-lactamine), Aminoglicozide, Sulfamide, Fluoroquinolone, Fenicoli, Macrolide, Glicilciline, Polipeptide ciclice.

Tabelul 6.6/ Table 6.6

Sinteza rezultatelor referitoare la numărul de tulpini ce au fost considerate rezistente/sensibile la diverse categorii antimicrobiene beta-lactamice/non-beta-lactamice

Summary of the results regarding the number of strains that were considered resistant / sensitive to various antimicrobial categories beta-lactam/non-beta-lactam

Categoria antimicrobiană	Antibiotic	Tulpini sensibile		Tulpini rezistente	
		Nr. izolate de origine animală	Nr. izolate umane	Nr. izolate de origine animală	Nr. izolate umane
Peniciline (Beta-lactamine)	ampicilină	0	0	118	5
	temocilina	118	5	0	0
Carbapeneme (Beta-lactamine)	meropenem	118	5	0	0
	imipenem	118	5	0	0
	ertapenem	118	5	0	0
Aminoglicozide	gentamicină	63	4	55	1
Sulfamide	sulfametoxazol	22	2	96	3
	trimetoprim	42	3	76	2
Fluoroquinolone	ciprofloxacin	52	2	66	3
	acid nalidixic	44	2	74	3

Categoria antimicro-biană	Antibiotic	Tulpini sensibile		Tulpini rezistente	
		Nr. izo-late de origine animală	Nr. izolate umane	Nr. izolate de origine animală	Nr. izolate umane
Fenicoli	cloramfenicol	62	4	56	1
Macrolide	azitromicină	82	5	36	0
Glicilcicliline	tigeciclină	118	5	0	0
Polipeptiddeciclice	colistin	115	5	3	0

În urma investigațiilor realizate cu scopul de a stabili gradul de rezistență/sensibilitate la alte clase de antibiotice pentru tulpinile confirmate fenotipic ca producătoare de ESBL/AmpC, s-a observat că nivelul de rezistență atât pentru izolatele de origine animală, cât și pentru cele de origine umană este crescut pentru antibioticele din clasele: beta-lactamine (100% rezistență la ampicilină), sulfonamide (rezistență la sulfamethoxazole 96/118 (81.36%) și 76/118 (64.41%) la trimethoprim (fig. 6.17); respectiv pentru izolatele umane 3/5 (60%) rezistență la sulfamethoxazole și 2/5 (40%) la trimethoprim (fig.6.18).

În ce privește categoria Fluoroquinolonelor, raportarea arată că nivelul de rezistență la ciprofloxacin și acidul nalidixic a fost peste 50%, astfel că din numărul total de tulpini de origine animală testate, 66/118 (55.93%) au fost rezistente la ciprofloxacin iar pentru acidul nalidixic (NAL) 74/118 (62.71%) tulpini au fost rezistente. Dintre izolatele de origine umană, atât pentru ciprofloxacin, cât și pentru acidul nalidixic, s-au înregistrat 3/5 (60%) tulpini rezistente.

După cum era de așteptat, cele mai multe izolate rezistente la ciprofloxacină au fost rezistente și la acidul nalidixic, atunci când s-a utilizat ECOFF ca praguri interpretative ale rezistenței. Există o corelație, frecvent întâlnită între cele două fluorochinolone (ciprofloxacin și acidul nalidixic): dacă ciprofloxacinul este rezistent, iar acidul nalidixic este sensibil pe placa testată, se consideră a fi un fenotip rar. În urma testării s-au obținut 2/118 astfel de tulpini de origine animală cu fenotip rar.

Pentru tulpinile de origine animală s-a înregistrat o rezistență crescută la gentamicină (aminoglicozide) și scăzută la colistin (Polipeptiddeciclice), respectiv 55/118 (46.61%) izolate rezistente la gentamicină și 3/118 (2.54%) izolate la colistin. Deși numărul de tulpini rezistente la colistin este mic, rezultatele obținute fenotipic sugerează practic administrarea acestui antibiotic în fermele de porcine. Colistinul este antibiotic de ultimă linie utilizat în terapia infecțiilor bacteriene multidrog rezistente de origine umană. Descoperirea genelor mcr-1, mcr-2, mcr-3 a schimbat complet optica asupra rezistenței antimicrobiene. Aceste gene favorizează transmiterea rezistenței mediata plasmidic la colistin și practic răspândirea cu rapiditate și pe scară largă a acesteia.

Colistinul trebuie să rămână antibiotic de rezervă pentru medicina umană și în acest sens utilizarea colistinului la porcine ca promotor de creștere și în scopuri profilactice ar trebui interzisă iar implementarea măsurilor durabile în fermele de porci pentru prevenirea infecțiilor microbiene ar trebui să fie încurajată și finanțată în mod activ. Cerceta-

rea științifică privind rezistența antimicrobiană la porcine ar trebui încurajată pentru a genera date care să ajute la reducerea exacerbării rezistenței la colistin la porci și în gunoiul de grajd. De asemenea, trasarea unor direcții care să asigure o utilizare terapeutică judicioasă a colistinului în ferme este de o importanță crucială.

Pentru tulpinile de origine umană, a fost raportată o singură tulpină rezistentă la gentamicină și toate cele 5 izolate analizate au fost sensibile la colistin.

Rezistența la azitromicină a izolatelor de origine animală a fost, în general, scăzută 36/118 (30.50%) în timp ce la cloramfenicol a fost înregistrată o rezistență medie 56/118 (47.46%). Pentru izolatele de origine umană nu au fost raportate tulpini rezistente la azitromicină iar la cloramfenicol o singură tulpină a fost rezistentă.

Pentru grupa glicilciclone, ce conține tigeciclina nu s-a înregistrat rezistență, toate tulpinile testate fiind sensibile. Testarea sensibilității tigeciclinei nu este simplă deoarece metoda poate fi influențată de oxidarea reactivilor de testare. Au fost descrise mai multe mecanisme de rezistență la tigeciclina a *Enterobacteriaceaelor* și acestea includ: activitatea crescută a pompelor de eflux (AcrAB), mutația proteinei ribozomale S10 și modificarea sistemului Mla implicat în transportul fosfolipidelor în membranele celulare (He ș.a., 2016).

Toate tulpinile analizate, atât de origine animală, cât și cele de origine umană, au fost sensibile la grupa Carbapenemelor (meropenem, ertapenem, imipenem), ceea ce înseamnă că fenotipic aceste tulpini nu produc enzime carbapenemaze care conferă rezistență la această grupă de antibiotice. De asemenea, rezultatele noastre sunt în conformitate cu literatura de specialitate care menționează că tulpinile producătoare de enzime ESBL/AmpC sunt sensibile la carbapeneme.

Toate izolatele de origine umană și animală au fost sensibile la timocielin, antibiotic din clasa penicilinelor (Beta-lactamine) care este utilizat în tratarea infecțiilor determinate de bacterii producătoare de beta-lactamaze.

Conform lui Magiorakos și col., o tulpină bacteriană ce prezintă rezistență la antibioticele din cel puțin 3 clase diferite este considerată a fi multidrog-rezistentă (Magiorakos ș.a., 2012). Atât izolatele prezumtiv ESBL/AmpC, de origine animală, cât și cele de origine umană, sunt asociate cu rezistența la Peniciline, Fluoroquinolone și Sulfonamide. Prin urmare, corelând criteriile menționate de Magiorakos, cu rezultatele obținute de noi, s-a observat că 55/118 (46.61%) tulpini de origine animală sunt cu rezistență multiplă la antibiotice (RMA și 2/5 (40%) de origine umană.

La nivelul UE, există un foarte mare interes în ceea ce privește studiul rezistenței la antimicrobiene a unor specii bacteriene cu caracter zoonotic, printre care și *E. coli*. Rețeaua europeană de supraveghere a consumului de antimicrobiene (ESAC-Net) a raportat, în 2015, faptul că România s-a situat pe locul doi în ceea ce privește consumul de antibacteriene de uz sistemic.

Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor și EFSA supraveghează periodic gradul de utilizare a antibioticelor în medicina veterinară. Raportul întocmit de aceștia în anul 2015 și publicat în 2017, arată că în România au fost izolate tulpini de *E. coli* cu rezistență peste media europeană (fig. 6.16).

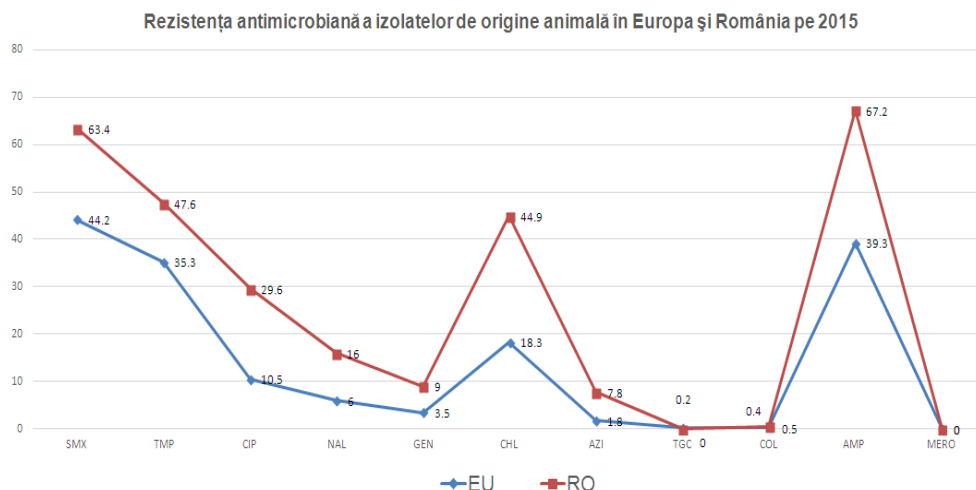


Fig. 6.16 Rezistența antimicrobiană a izolatelor de origine animală în Europa și România pe 2015(original)

Fig. 6.16 Antimicrobial resistance of animal isolates in Europe and Romania in 2015(original)

Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor și EFSA supraveghează periodic gradul de utilizare a antibioticelor în medicina veterinară. Raportul întocmit de aceștia în anul 2015 și publicat în 2017, arată că în România au fost izolate tulpini de *E. coli* cu rezistență peste media europeană (fig. 6.16).

Rezultatele obținute de noi pentru izolatele de origine animală și umană sunt în concordanță cu literatura de specialitate și, mai mult decât atât, ele sunt coroborate cu statisticile privind clasele de antibiotice ce sunt utilizate cel mai frecvent în România în medicina veterinară. Conform raportului European Medicines Agency (EMA), în anul 2016 exista un nivel ridicat de consum pentru antibioticele din clasele beta-lactamine, sulfonamide și aminoglicozide (European Medicine Agency, 2016).

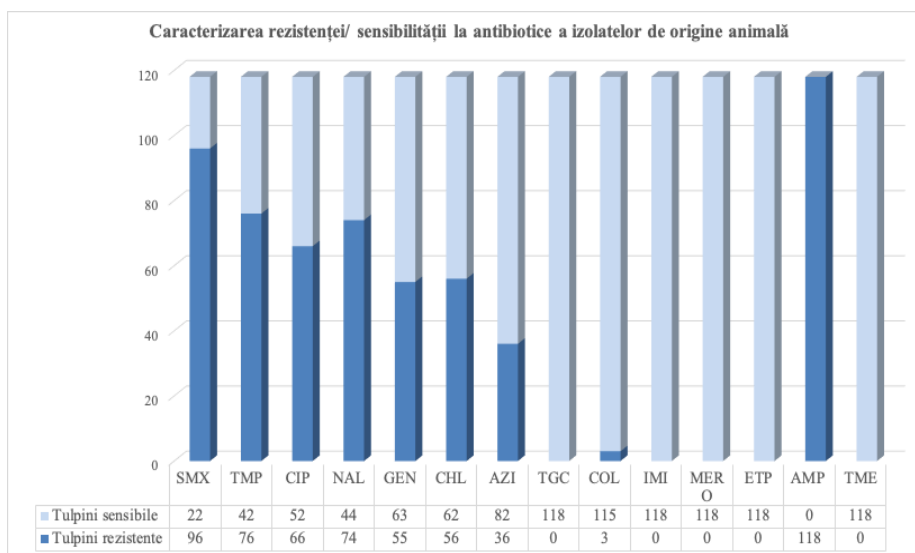


Fig. 6.17 Caracterizarea rezistenței/sensibilității la antibiotice a izolatelor de origine animală

Fig. 6.17 Characterization of antibiotic resistance / sensitivity of animal isolates

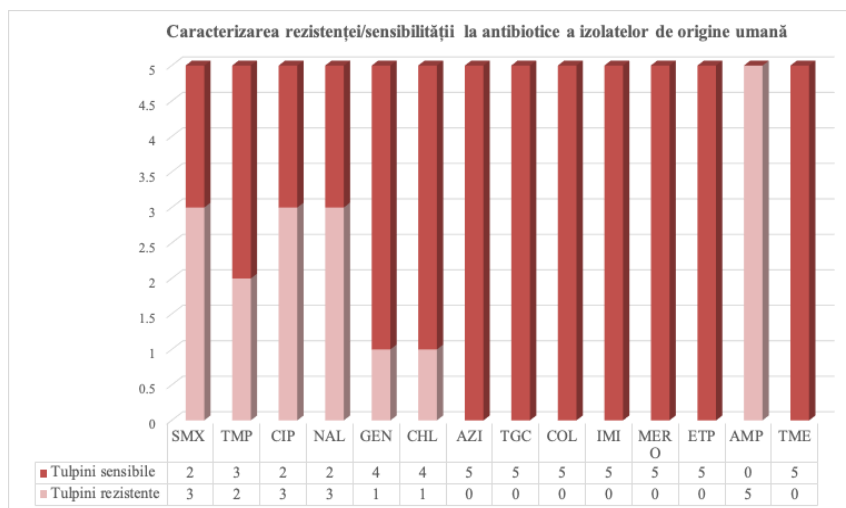


Fig. 6.18 Caracterizarea rezistenței/sensibilității la antibiotice a izolatelor de origine umană

Fig. 6.18 Characterization of antibiotic resistance / sensitivity of isolates of human origin

6.3. Concluzii parțiale

1. În urma prelucrării probelor de origine animală, au fost izolate 118/200 (59%) tulpini de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare ESBL/AmpC, procent care situează România peste media europeană (31,9 %).
2. La tulpinile de origine umană, în urma detecției ESBL/AmpC, au fost identificate 5/32 (15.62%) izolate de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare ESBL/AmpC.
3. Toate tulpinile (de origine umană și animală) identificate pe mediul specific, agar MacConkey suplimentat cu cefotaxim (MC+CTX), au fost confirmate fenotipic ca fiind ESBL/AmpC.
4. Indiferent de originea probei, fenotipul de rezistență majoritar identificat a fost cel ESBL, cu 77/118 (65.25%) pentru izolatele de origine animală, respectiv 3/5 (60%) pentru izolatele umane.
5. Prevalența crescută, de 59%, a tulpinilor de *E. coli* producătoare ESBL/AmpC provenite de la suinele abatorizate, sugerează că utilizarea intensă și inadecvată a cefalosporinelor în producția animalieră favorizează sau poate fi asociată cu apariția acestor tulpini la animale. De asemenea, prin intermediul alimentelor (crude sau insuficient preparate termic) sau prin contactul direct, există posibilitatea de transmitere a acestor tulpini de la animale la om.
6. Deși numărul de tulpini rezistente la colistin este mic, rezultatele obținute în urma caracterizării fenotipice sugerează, practic, administrarea în continuare a acestui antibiotic în fermele de porcine. În acest context, trasarea unor direcții care să asigure o utilizare terapeutică judicioasă a colistinului în ferme este de o importanță crucială.

CAPITOLUL 7. CARACTERIZAREA SUBSTRATULUI MOLECULAR AL TULPINILOR DE *E. COLI* ESBL POZITIVE IZOLATE DE LA PORCI ABATORIZAȚI ȘI PERSONAL DIN FERME

CHAPTER 7. CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR SUBSTRATE OF *E. COLL* ESBL POSITIVE ISOLATED FROM ABATORIZED PIGS AND FARM STAFF

7.1 Material și metodă de lucru

În urma analizei fenotipice, tulpinile de *E. coli* sintetizatoare ESBL/AmpC (118 de origine animală și 5 de origine umană) izolate din trei județe (Iași, Botoșani și Suceava) în perioada 2016-2018, au fost supuse analizei prin PCR. Scopul acestei etape a fost de a caracteriza din punct de vedere molecular tulpinile de *E. coli* ESBL/AmpC izolate în urma detecției ESBL. Astfel, sunt descrise tehnici PCR folosite pentru identificarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL/AmpC, identificarea altor markeri genetici asociați cu rezistența mediată plasmidic la fluroquinolone sau colistin și încadrarea izolatelor de *E. coli* în principalele grupuri filogenetice.

Extracția ADN-ului bacterian din tulpinile izolate.

Prima etapă de lucru a fost extracția ADN-ului bacterian prin tehnica „*boiled preps*”. Această etapă are același protocol de lucru pentru toate tulpinile confirmate fenotipic. Tehnica presupune recoltarea a 3-5 colonii de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare de ESBL/AmpC de pe mediul Agar Columbia sânge (Oxoid) și suspendarea lor într-un mililitru de apă ultrapură.



Fig. 7.1 Extracția ADN-ului bacterian prin metoda „*boiled preps*” (original)

Fig. 7.1 Extraction of bacterial DNA bythe “*boiled preps*” method (original)

După omogenizarea culturii, următoarea etapă implică menținerea timp de 10 minute pe termomixer, la o temperatură de 90°C, după care centrifugarea pentru 2 minute la 10.000 de rotații/minut. În urma centrifugării s-au extras 0,9 ml supernatant pentru fiecare tulpină. (fig. 7.1)

Markerii genetici au fost identificați prin metoda PCR clasic, respectând protocolul de lucru pentru fiecare genă.

7.1.1 Identificarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL

Beta-lactamazele cu spectru extins (ESBL) sunt frecvent mediate de genele *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA} iar pentru identificarea lor au fost dezvoltate numeroase metode de detecție moleculară, bazate pe teste PCR.

Identificarea substratului genetic al beta-lactamazelor cu spectru extins (ESBL) a avut la bază identificarea prin PCR a principalelor gene de rezistență *bla*_{CTX-M}. Enzimele ESBL de tipul CTX-M au fost clasificate în 5 grupuri principale: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 și CTX-M-25. Cercetările noastre s-au bazat pe identificarea genelor ce codifică enzimele din cele două grupuri mai frecvent întâlnite, CTX-M-1 și CTX-M-9.

De asemenea, protocolul de lucru a urmărit și identificarea genelor *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA} ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins.

Detecția genelor *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA} s-a realizat prin PCR multiplex, iar rezultatele obținute au fost confirmate ulterior prin PCR simplex, pentru fiecare genă în parte.

Testul PCR clasic pentru identificarea CTX-M.

Materialele folosite au fost:

- Kit MyTaqTMHSRedMix (Bioline), mix utilizat pentru PCR multiplex;



Fig. 7.2 Kit MyTaqTMHSRedMix (Bioline) (*original*)

Fig. 7.2 Kit MyTaqTMHSRedMix (Bioline) (*original*)

- primerii specifici pentru fiecare genă, reconstituiți conform fișei tehnice și redați schematic în tabelul 7.1.

Toți reactivii au fost scoși de la congelator și depozitați pe gheață până la utilizare. Înainte de utilizare au fost vortexați, apoi centrifugați.

Primerii utilizați pentru identificarea celor mai importante gene ce codifică enzimele CTX-M, TEM, SHV, OXA

Primers used to identify the most important genes encoding the enzymes CTX-M, TEM, SHV, OXA

Gena	Primeri	Mărimea ampliconului (bp)	Referințe
<i>bla_{CTX-M-U}</i>	CTX-MU1: ATGTGCAGYACCA GTAARGTKATGGC.	593	Wedley ș.a., 2011
	CTX-MU2: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG		
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	CTX-M-1F:ATGGTTAAAAAATCACTGCG	876	
	CTX-M-1R: TTACAAACCGTCGGTGAC		
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	CTX-M-9F: ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC	876	
	CTX-M-9R : TTACAGCCCTTCGGCGATG		
<i>bla_{TEM}</i>	Multi TSO-T_for: CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC	800	Dallenne ș.a., 2010
	Multi TSO-T_rev: CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>bla_{SHV}</i>	Multi TSO-S_for: AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	713	
	Multi TSO-S_rev: ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<i>bla_{OXA}</i>	Multi TSO-O_for: GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	
	Multi TSO-O rev: GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG		

Cuplarea ADN-ului bacterian extras cu Master-mixul.

În tuburi Eppendorf s-a amestecat cantitatea de 23μl master-mix de reacție și 2μl ADN bacterian extras, pentru genele *bla_{CTX-M-U}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*. Pentru genele *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{OXA}* s-au folosit 45 μl de master-mix de reacție, amestecați cu 5 μl de ADN bacterian. Omogenizarea amestecurilor a fost făcută prin pipetare pe gheață.

Validarea etapei de cuplare a fost făcută prin introducerea în paralel a unui martor pozitiv de control al mixului (o probă de ADN certificat pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și al unui martor negativ de control al mixului (apă). Amplificarea s-a realizat în thermocycler (Bio Rad). (fig. 7.3)



Fig. 7.3 Etapa de cuplare și amplificare în Icyler (*original*)

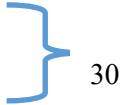
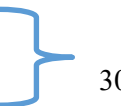
Fig. 7.3 Coupling and amplification stage in Icyler (*original*)

Tuburile cu amestecul de reacție sunt introduse mai apoi în Icyler, urmând cursul programului de amplificare.

Temperaturile specifice pentru fiecare etapă PCR sunt redade schematic în tabelul 7.2.

Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins

PCR amplification conditions for the identification of genes encoding extended-spectrum beta-lactamase enzymes

Gena	Condițiile		Referințe
CTX-M-U	94°C- 3 minute	 30	Wedley ș.a., 2011
	94°C- 60 secunde		
	58°C- 60 secunde		
	72°C- 60 secunde		
	72°C- 5minute		
CTX-M1	94°C- 3 minute	 30	Wedley ș.a., 2011
	94°C- 60 secunde		
CTX-M-9	58°C- 60 secunde		
	72°C- 60 secunde		
	72°C- 7 minute		
Multiplex TEM/SHV/OXA	94°C- 10 minute	 30	Dallenne ș.a.,2010
	94°C- 40 secunde		
	60°C- 40 secunde		
	72°C- 60 secunde		
	72°C- 7 minute		

Electroforeza în gel de agaroză.

Gelul de agaroză se prepară (1.5% agaroză în TBE) din 1.35 g agaroză și 90 ml TBE 1 X (cantitatea este pentru un gel mare). Recipientul cu aceste cantități a fost introdus în cuptorul cu microunde pentru dizolvarea agarozei, timp de 2 min. Soluția obținută a fost răcită sub un jet de apă rece, până la o temperatură de aproximativ 50-60°C, după care s-au adăugat 7.5 microlitri EtBr 10mg/ml. Agaroză obținută a fost turnată imediat în tăvița de electroforeză, inserată în suportul „casting gel” unde sunt fixați pieptenii. S-au eliminat bulele de aer cu ajutorul unui tips și apoi gelul a fost lăsat să polimerizeze (răcirea gelului și întărirea sa, aproximativ 20 min). Gelul obținut a fost fixat pe tăvița din cuva de electroforeză ce conține TBE 1X, după care a urmat încărcarea probelor. Godeurile gelului de agaroză din cuva de electroforeză au fost încărcate cu câte 9μl din amestec de reacție. În primul godeu a fost încărcat markerul molecular.

După terminarea încărcării gelului în cuva de electroforeză, s-a adăugat EtBr 10mg/ml – 12,5μl în tamponul TBE 1X de migrare, în zona anodului. Derularea programului de electroforeză începe, doar după fixarea capacul aparatului și apoi a parametrilor sursei la 100 V, 1,5A, timp de 40 min. După terminarea electroforezei, gelul a fost analizat la UV în aparatul GelDoc (Bio-Rad). (fig.7.4).



Fig. 7.4 Încărcarea produșilor PCR în gelul de agaroză și analiza în GelDoc (original)

Fig. 7.4 Loading PCR products into agarose gel and GelDoc analysis (original)

Pentru testul PCR, rezultatele de „pozitiv” sau „negativ” s-au stabilit în urma analizei benzilor specifice obținute prin electroforeză. Testul s-a considerat validat când martorii pozitivi (de extracție și mix) au fost confirmați pozitivi, iar martorii negativi (de extracție și mix) au fost confirmați negativi.

7.1.2 Identificarea principalelor gene AmpC

Principala diferență dintre enzimele AmpC și ESBL este lipsa de activitate a enzimelor AmpC împotriva cefalosporinelor de generația a patra (de exemplu cefepim) și incapacitatea de realiza reversia rezistenței utilizând acidului clavulanic (Woodford ș.a., 2007). Enzimele AmpC beta-lactamaze mediate de plasmide conduc la creșterea rezistenței la cefoxitin dar nu interferează cu inhibitorii beta-lactamazei ce oferă rezistență la carbapeneme. (Bush ș.a., 1995).

Tulpinile de *E. coli* produc enzime AmpC beta-lactamaze utilizând două mecanisme. În primul rând, toate tulpinile au gene cromozomiale ce codifică pentru producția de enzime AmpC (Olsson ș.a., 1983). Nivelul acestei producții este strict controlat și se regăsește la un nivel atât de scăzut încât să nu producă rezistență detectabilă. (Caroff ș.a., 2000). În al doilea rând, tulpinile de *E. coli* pot dobândi informația genetică pentru codificarea enzimei AmpC de la alte specii. Plasmidele purtătoare de gene AmpC sunt derivate de la specii precum *Enterobacter* sp. și *Citrobacter* sp.

Prima genă plasmidică ce codifică pentru AmpC a fost caracterizată de Bauernfeind ș.a. (1989), fiind identificată la o tulpină de *Klebsiella pneumoniae*. Mai târziu, Papanicolaou ș.a. (1990) a identificat o genă plasmidă numită MIR-1, profilul de inhibare indicând o enzimă beta-lactamază.

Genele AmpC beta-lactamaze mediate plasmidic reprezintă o nouă amenințare la sănătatea publică, deoarece ele conferă rezistență la cefamicine și nu sunt afectate de inhibitorii de beta-lactamaze. Acest mecanism de rezistență a fost identificat pe întreg mapamondul, fiind implicat în apariția de focare nosocomiale și pare să aibă o prevalență cu creștere progresivă.

Identificarea genelor AmpC beta-lactamaze la tulpinile analizate s-a realizat prin tehnici de biologie moleculară, prin PCR simplex.

Testul PCR clasic pentru identificarea genei AmpC.

Materialele folosite au fost:

- Kit MyTaqTMHSRedMix (Bioline), mix gata de utilizare pentru PCR multiplex;
- primerii specifici pentru gena *bla*_{CIT-M}, reconstituiți conform fișei tehnice: *bla*_{CIT-M}:
F: 5'-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3' și
*bla*_{CIT-M}: R: 5'-TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3'.

Toți reactivii au fost scoși de la congelator și depozitați pe gheață până la utilizare. Înainte de utilizare au fost vortexați, apoi centrifugați.

Cuplarea ADN-ului bacterian extras cu Master-mixul.

În tuburi Eppendorf de 0,2 ml se pipetează cantitatea de 23μl mix de reacție și 2μl ADN bacterian extras pentru gena *bla*_{CIT-M}, amestecul omogenizându-se prin pipetare pe gheață.

Etapă de cuplare a fost validată prin introducerea în paralel a unui martor pozitiv de control al mixului (o probă de ADN certificat pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă).

Tuburile cu amestecul de reacție sunt introduse mai apoi în Icyler (Bio Rad), urmând etapa de amplificare, conform tabelului 7.3

Tabelul 7.3/Table 7.3

Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze

Amplification conditions for identification of gene encoding AmpC beta-lactamaze enzymes		
Gena	Condițiile	Referințe
CIT-M	94°C- 3 minute 94°C- 30 secunde 64°C- 30 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 7 minute } X 25	Kao ș.a.,2010

Lungimea ampliconilor obținuți în urma etapei de electroforeză a fost de 593 perechi de baze (bp).

7.1.3 Identificarea unor markeri genetici asociați cu rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone/Colistin

Genele *qnrA*, *qnrB* și *qnrS* codifică rezistența mediată plasmidic la fluoroquinolone iar *mcr-1* și *mcr-2* sunt genele care codifică rezistența mediată plasmidic la colistin.

Identificarea acestora a fost făcută prin PCR multiplex, iar rezultatele obținute au fost confirmate ulterior prin PCR simplex, respectând condițiile de lucru pentru fiecare genă. Ampliconii obținuți în urma reacției PCR au fost citați prin electroforeza.

Testul PCR clasic pentru identificarea qnrA, qnrB, qnrS, mcr-1 și mcr-2.

Materialele folosite au fost:

- Kit MyTaqTMHSRedMix (Bioline), un mix gata de utilizare pentru PCR multiplex;
- primerii specifici pentru genele fluorochinolone qnrA, qnrB, qnrS (Bioline), conform tabelulu 7.4;
- primerii specifici pentru genele colistin mcr-1 și mcr-2 (Bioline), reconstituiți conform fișei tehnice.

Toți reactivii, după decongelare, sunt depozitați pe gheață până la utilizare. Înainte de utilizare au fost vortexați, apoi centrifugați.

Tabelul 7.4/Table 7.4

Primerii utilizați pentru identificarea celor mai importante gene ce codifică rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone și Colistin

Primers used to identify the most important genes encoding plasmid-mediated resistance to Fluoroquinolone and Colistin

Gena	Primeri	Mărimea ampliconului (bp)	Referințe
qnrA	F:5'-ATTTCTCACGCCAGGATTG-3' R:5'-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3'	516	Robicsek ș.a., 2006
qnrB	F:5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' R:5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'	469	
qnrS	F:5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3' R:5'-TAAATTGGCACCTGTAGGC-3'	417	
mcr-1	CLR5-F:5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' CLR5-R:5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	309	Liu ș.a., 2016
mcr-2	MCR2-F:5'-TGGTACAGCCCCTTTATT-3' MCR2-R:5'-GCTTGAGATTGGGTATGA-3'	190	Xavier ș.a., 2016

Cuplarea ADN-ului bacterian extras cu Master-mixul.

În tuburi Eppendorf de 0,2 ml se pipetează cantitatea de 45μl mix de reacție și 5μl ADN bacterian extras pentru genele qnrA, qnrB, qnrS și cantitatea de 23μl amestec de reacție și 2μl ADN bacterian extras pentru genele mcr-1 și mcr-2. Omogenizarea amestecului s-a făcut prin pipetare pe gheață.

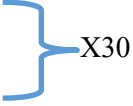
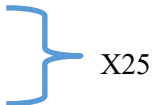
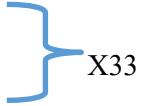
Etapă de cuplare a fost validată prin introducerea în paralel a unui martor pozitiv de control al mixului (o probă de ADN certificat pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă).

Tuburile cu amestecul de reacție sunt introduse mai apoi în Icyler (Bio Rad), urmând etapa de amplificare, conform tabelului 7.5.

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului bacterian au o dimensiune în concordanță cu tabelul 7.5.

Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze
PCR

Amplification conditions for identification of genes encoding AmpC beta-lactamaze enzymes

Gena	Condițiile	Lungimea ampliconului (bp)	Referințe
Multiplex qnrA, qnrB, qnrS		516	Robicsek ș.a., 2006
		469	
		417	
mcr-1		309	Liu ș.a., 2016
mcr-2		190	Xavier ș.a., 2016

7.1.4 Încadrarea izolatelor de *E. coli* în principalele grupuri filogenetice

Anumite specii bacteriene prezintă o specificitate a gazdei sau a comportamentului, limitându-și ecologia la situații precise și stereotipuri.

Testul PCR a fost descris de Clermont ș.a, în 2000, dar clasificarea și nomenclatura grupurilor a fost descrisă ulterior (Branger ș.a, 2005).

Primerii pentru cele 3 secvențe căutate, condițiile de amplificare și lungimea ampliconilor sunt descrise în tabelele 7.6 și 7.7.

Clasificarea grupurilor va fi următoarea:

1. gupa filogenetică A (-/-),
2. grupa filogenetică B1 (-/+),
3. grupa filogenetică B2 (+/+),
4. grupa filogenetică D (+/-).

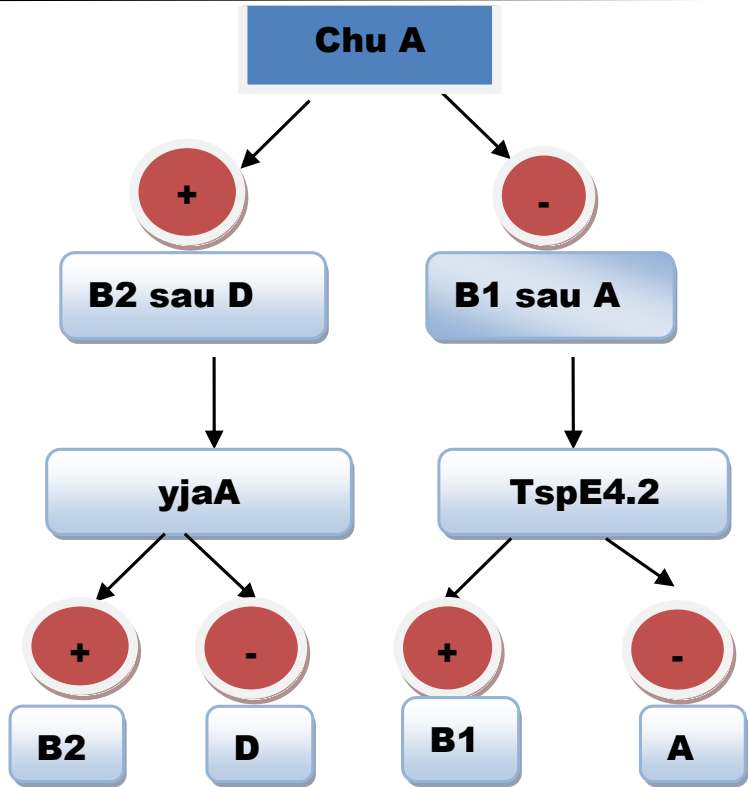


Fig. 7.5 Încadrarea în filogrupuri a unei tulpini de *E. coli* prin utilizarea genelor *chuA* și *yjaA* și a fragmentului de ADN TSPE4.C2. prin amplificare PCR (conform Clermont, 2000)

Fig. 7.5 Classification of an *E. coli* strain by phylogroups using the *chuA* and *yjaA* genes and the TSPE4.C2 DNA fragment. By PCR amplification (according to Clermont, 2000)

Testul PCR clasic pentru identificarea genelor ChuA, YjaA, TspE4.C2.

Materialele folosite au fost:

- Kit MyTaq™HSRedMix (Bioline), un mix gata de utilizare pentru PCR multi-plex;
- primerii specifici pentru genele ChuA, YjaA și fragmentul de ADN cromozomial TspE4.C2 (Bioline), reconstituiți corespunzător fișei tehnice, tabel 7.6.

Tabelul 7.6 / Table 7.6

Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ChuA, YjaA și a fragmentului de ADN TspE4.C2

PCR amplification parameters for gene identification ChuA, YjaA and the TspE4.C2 DNA fragment

Gena	Condițiile	Referințe
Multiplex ChuA, YjaA, TspE4.C2	94°C- 5 minute 94°C- 30secunde 55°C- 30secunde 72°C- 30secunde 72°C- 7 minute X30	Clermont ș.a., 2000

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului bacterian au o dimensiune potrivit tabelului 7.7.

Tabelul 7.7 / Table 7.7

Lungimea ampliconilor(bp) obținuți în urma testului PCR
The length of the amplicons (bp) obtained after the PCR test

Primeri	Secvențele de nucleotide 5'-3'	Lungimea ampliconului (bp)	Tempera- tura de alinie specifică
ChuA	ChuA.1: 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' ChuA.2: 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	279	55°C
YjaA	YjaA1: 5'-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG-3' YjaA2: 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211	
TspE4. C2	TspE4.C2.1: 5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' TspE4.C2.2: 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152	

7.2 Rezultate și discuții

7.2.1 Prevalența tulpinilor *E. coli* ESBL caracterizate molecular prin genele ce codifică enzimele CTX-M, TEM, SHV și OXA

Primele tulpini de tip beta-lactamaze cu un spectru extins de activitate au apărut ca urmare a mutațiilor de la nivelul genelor ce codifică enzimele TEM-1 și SHV-1; frecvent întâlnite ca enzime native la *Enterobacteriaceae*. Aceste enzime noi (de exemplu, SHV-2 și SHV-5) au fost numite beta-lactamaze cu spectru extins datorită capacității lor de a hidroliza cefalosporinele de generația a treia, dar nu și cefamicinele. În ultimul deceniu, a existat o schimbare semnificativă în ceea ce privește prevalența diferitelor tipuri ESBL, enzimele TEM și SHV fiind în mare parte înlocuite de enzimele CTX-M (Livermore ș.a., 2007). Cele mai semnificative gene β -lactamazice sunt variante ale CTX-M, SHV, TEM și OXA, prezența acestora mărind specificitatea substratului împotriva cefazidimei, cefotaximei și ceftriaxonului (Pfeifer ș.a., 2010)

Tabelul 7.8 /Table 7.8

Principalele gene identificate la izolatele de *E. coli* ESBL
The main genes identified in *E. coli* ESBL isolates

Gena bla	Nr de izolate/ grup	
	Porc n=118	Om n=5
CTX-M-U	72/118	4/5
CTX-M-1	44/72	3/4
CTX-M-9	18/72	0/4
SHV	44/118	1/5
TEM	2/118	0/5
OXA	1/118	0/5

În vederea diferențierii principalelor gene ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins au fost analizate, prin tehnica PCR, 123 tulpini de *E. coli*, din care 118/123 de origine animală și 5/123 de origine umană. S-a urmărit izolarea principalelor gene ce codifică enzimele ESBL: CTX-M, TEM, SHV și OXA. De asemeni, pentru enzimele codate de genele bla_{CTX-M-U}, s-a realizat caracterizarea acestora în raport cu două din cele 5 grupuri principale: CTX-M-1, CTX-M-9.

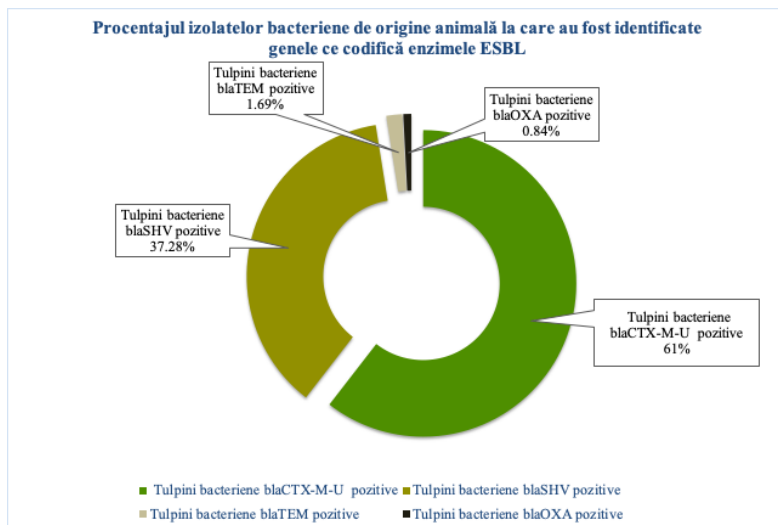


Fig.7.6 Principalele gene identificate la tulpinile de *E. coli* izolate de la porcii abatorizați

Fig. 7.6 The main genes identified in *E. coli* strains isolated from slaughtered pigs

Din cele 118 tulpini de origine animală analizate, testele de biologie moleculară au evidențiat la 72/118 (61 %) tulpini prezența genei bla_{CTX-M-U} (fig. 7.6, tabelul 7.8 și fig. 7.7).



Fig. 7.7 Rezultatele testului PCR pentru gena bla_{CTX-M-U}

Fig. 7.7 PCR test results for bla_{CTX-M-U} gene

Caracterizarea grupurilor CTX-M la tulpinile de origine animală a semnalat prezența grupului CTX-M-1 la 44/72 (61.11%) dintre tulpinile analizate, acesta fiind grupul dominant (fig.7.8), în timp ce grupul CTX-M-9 a fost identificat la 18/72 (25 %) dintre tulpini. De asemenea, 10/72 (13.89%) tulpini de origine animală cu semnal pozitiv pentru gena *bla*_{CTX-M-U} nu au aparținut niciunuia din cele două grupuri menționate anterior (fig.7.9).

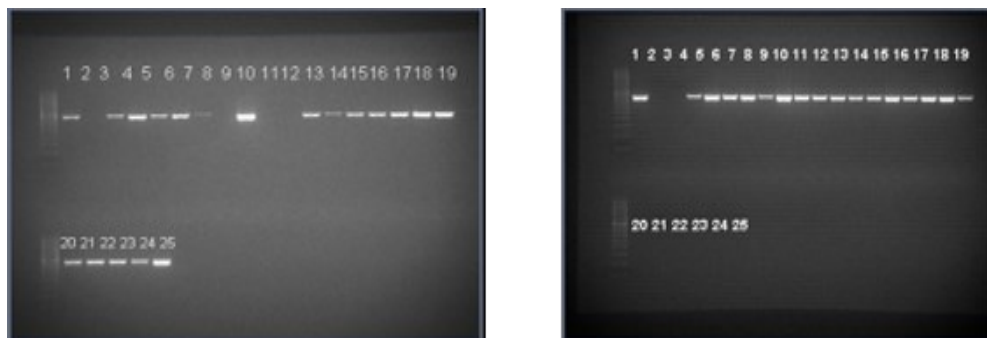


Fig. 7.8 Rezultatele testului PCR pentru gena *bla*_{CTX-M-1} și *bla*_{CTX-M-9}

Fig. 7.8 PCR test results for *bla*_{CTX-M-1} și *bla*_{CTX-M-9} gene

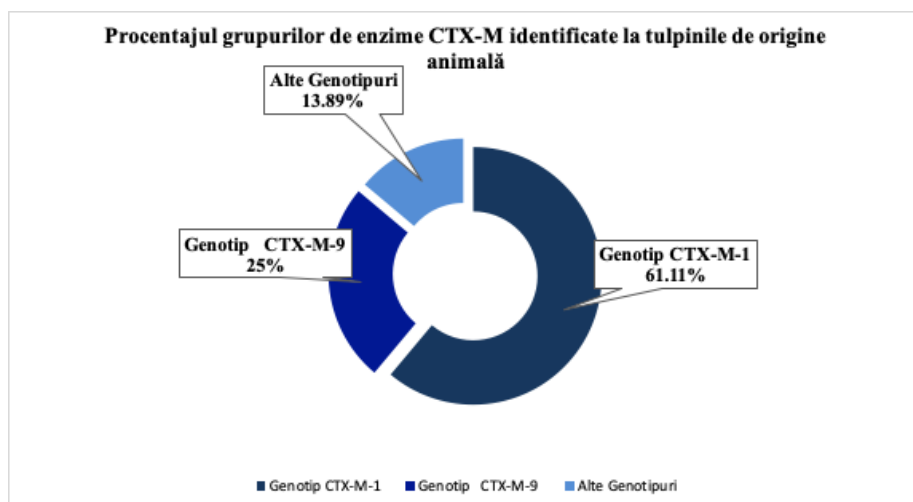


Fig.7.9 Procentajul grupurilor de enzime CTX-M identificate la tulpinile de origine animală

Fig.7.9 Percentage of groups of CTX-M enzymes identified in strains of animal origin

Enzimele ESBL cu spectru extins fac parte în principal din categoria enzimelor TEM și SHV, cu unele mici excepții și anume: TEM-1, TEM-3 și TEM-13 (Ewers ș.a., 2011; Livermore, 1995). Dintre enzimele OXA, doar OXA-2, OXA-10 și derivații acestora sunt producătoare de enzime beta-lactamaze, restul fiind de tip non-ESBL (Ewers ș.a., 2011).

Prezența genelor *bla_{SHV}* a fost identificată la 44/118 (37.28%) tulpini de origine animală, în timp ce prezența genelor *bla_{TEM}* la doar 2/118 tulpini (1.69%) dintre izolate iar *bla_{OXA}* la o singură tulpină de origine animală - 1/118 (1,40%) (fig.7.6) (fig.7.10).



Fig. 7.10 Rezultatele testării prin PCR multiplex utilizând primerii TEM, SHV și OXA

Fig. 7.10 Results of multiplex PCR testing using TEM, SHV et OXA

Prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins în tulpinile de *E. coli* de origine animală confirmă utilizarea în fermele de porcine a antibioticelor din categoria beta-lactamine sau a fluoroquinolonelor.

Studiul realizat de noi privind caracterizarea substratului molecular al tulpinilor de *E. coli* ESBL pozitive izolate de la porcii abatorizați este primul de acest fel realizat în NE-ul României.

Analizând comparativ prevalența (61%) genelor de tip *bla_{CTX-M-U}*, izolate de la porcii abatorizați, cu prevalența acelorași gene obținută de Măciucă și col. în 2014 pentru puii broiler în România, observăm că prevalența obținută de noi este considerabil mai mare, față de 36,95% obținută în studiul amintit anterior. De asemenea, studii similare din Europa (Danemarca, Olanda) au pus în evidență prezența genelor din grupurile CTX-M-1 și CTX-M-9 ca fiind predominante (Hansen K.H., 2013; Dohmen, 2017).

Ca și în cazul izolatelor de origine animală, cele 5 tulpini de *E. coli* de origine umană obținute în urma screening-ului ESBL au fost analizate molecular.

Prevalența genelor *bla_{CTX-M-U}* pentru izolatele umane este de 4/5 (80%). Tulpinile pozitive pentru gena *bla_{CTX-M-U}* au fost caracterizate molecular din punct de vedere al apartenenței la două din cele 5 grupuri principale de enzime CTX-M. Pentru grupul de enzime CTX-M-1 au fost identificate pozitive 75% (3/4) dintre tulpini iar pentru grupul CTX-M-9 nu au fost identificate tulpini pozitive. De asemenea, ca și în cazul izolatelor de origine animală, o tulpină (25%) nu a aparținut niciunuia din cele 2 grupuri de enzime analizate (fig. 7.11; fig. 7.12).

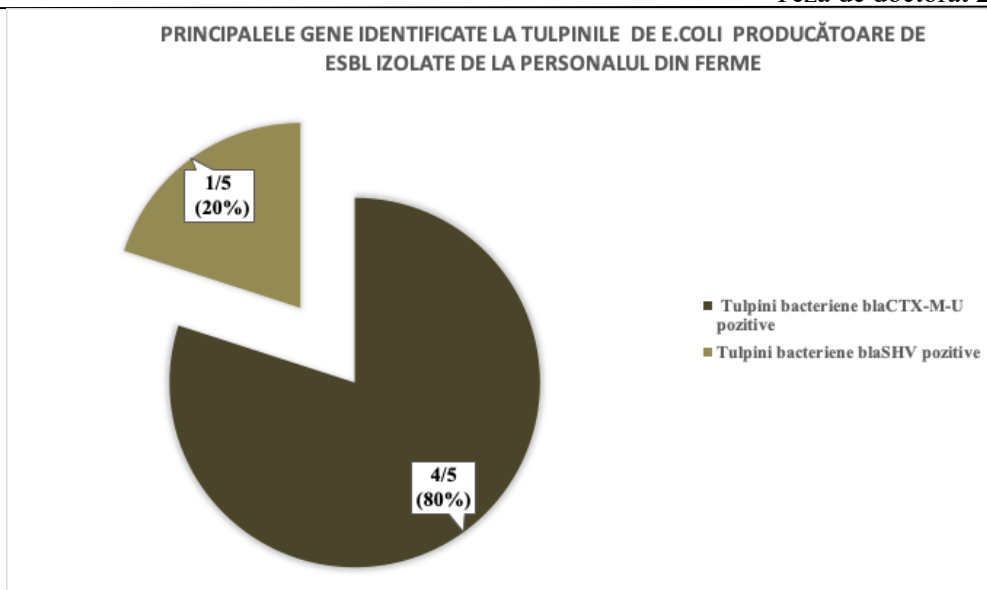
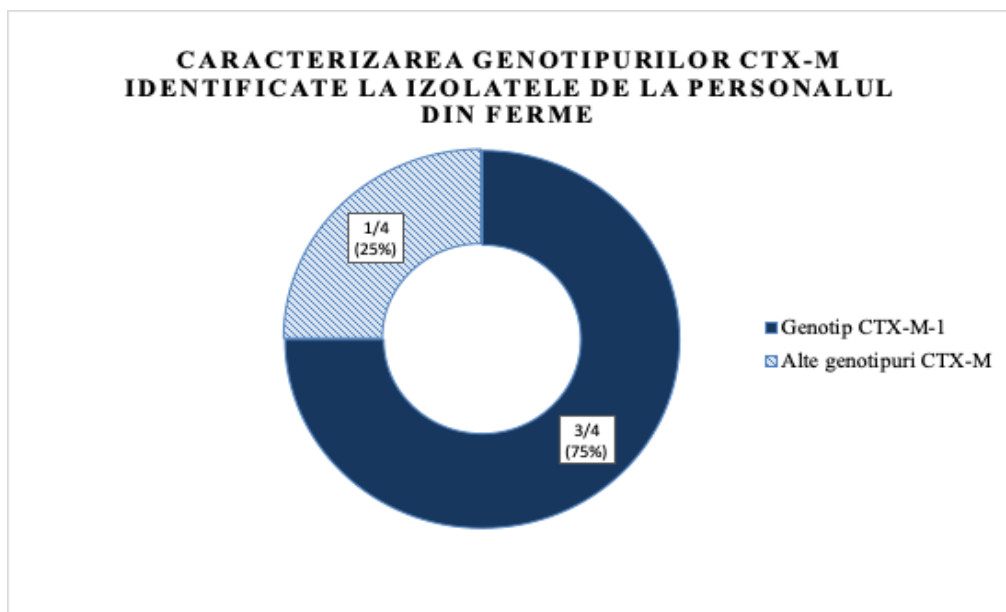
Fig.7.11 Principalele gene identificate la tulpinile de *E. coli* pentru izolatele umaneFig.7.11 The main genes identified in *E. coli* strains for human isolates

Fig.7.12 Principalele genotipuri CTX-M identificate la izolatele de origine umană

Fig.7.12 The main CTX-M genotypes identified in isolates of human origin

Identificarea genelor *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA} pentru tulpinile de origine umană au condus la următoarele rezultate:

- gena *bla*_{TEM} și *bla*_{OXA} nu a fost identificată la nicio tulpină analizată;
- gena *bla*_{SHV} a fost identificată la 1/5 (20%) din izolatele de *E. coli* (tabelul 7.9; fig.7.11).

Prevalența și combinația genelor identificate în izolatele de *E. coli* de origine umană și animală
The prevalence and combination of genes are identified in *E. coli* isolates of human and animal origin

Combinația de gene bla	Nr. de izolate/grup	
	Porc n=118	Om n=5
Total grup CTX-M-U	72/118 (61%)	4/5 (80%)
Total Grupul CTX-M-1	44/72 (61.11%)	3/4 (75%)
Grupul CTX-M-1, SHV	25/118	0/5
Grup CTX-M-1, SHV, CIT-M	1/118	1/5
Grup CTX-M-1, OXA	1/118	0/5
Grupul CTX-M-U, TEM, qnr A	1/118	0/5
Grupul CTX-M-U, TEM, SHV, qnr S	1/118	0/5
Grupul CTX-M-U, CTX-M-1, SHV,qnr B	1/118	0/5

Tabelul 7.10/Table 7.10

Sinteza rezultatelor privind caracterizarea substratului molecular al izolatelor de
E. coli CTX-M pozitive
Synthesis of the results regarding the characterization of the molecular substrate of
E. coli isolates CTX-M positive

Sursa	Nr. Izolate	Tip CTX-M	Gene de rezistență asociate
porc	17	CTX-M-1	-
om	2	CTX-M-1	-
porc	25	CTX-M-1	SHV
om	1	CTX-M-1	SHV
porc	1	CTX-M-1	OXA
porc	1	CTX-M-1	qnrS
porc	1	CTX-M-9	-
porc	17	CTX-M-9	SHV
porc	6	CTX-M-U	-
om	1	CTX-M-U	-
porc	2	CTX-M-U	TEM
porc	1	CTX-M-U	SHV
porc	1	CTX-M-U	qnrB

Atât pentru izolatele de origine animală, cât și pentru cele de origine umană, genele *bla*_{CTX-M-U} au fost identificate fie singure, fie în combinație cu genele *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} sau *bla*_{OXA}. Rezultatele obținute sunt sintetizate în tabelul 7.10.

Deși numărul de tulpini producătoare de ESBL de origine umană analizate este mic, rezultatele obținute de noi pentru identificarea spectrului de gene *bla*_{CTX-M-U} în populația de *E. coli* de origine umană sunt în concordanță cu rezultatele altor studii realizate în România pe tulpini de enterobacterii ESBL pozitive de origine umană. De exemplu, în

anul 2012, Miftode și colaboratorii au realizat un studiu prospectiv de cohortă ce a urmărit caracterizarea grupurilor de enzime CTX-M prezente la tulpinile de *E. coli* izolate de la pacienți cu vârste mai mici de 50 de ani iar rezultatele au indicat că izolatele producătoare de CTX-M-15 (ce face parte din grupul CTX-M-1) au avut frecvența cea mai crescută, urmate imediat de izolatele producătoare de CTX-M-9 (Miftode ș.a., 2012). De asemenea, Măciucă I., în anul 2014, a semnalat prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins din grupurile CTX-M-1 (grupul dominant), CTX-M-9 și CTX-M-2 la tulpini de *E. coli* izolate din cazuri clinice umane (Măciucă, 2014).

Apariția bacteriilor producătoare de ESBL la diferite animale producătoare de alimente a fost semnalată din ce în ce mai mult în ultimii ani (Carattoli, 2008, Li., 2007). CTX-M-1 a fost primul tip descoperit și raportat în Danemarca, la porc în 2005.

Dacă raportăm rezultatele obținute de noi la cele existente în partea de est a Europei, acestea sunt similare cu cele din literatura de specialitate care menționează grupul de enzime CTX-M-1 (CTX-M-15; CTX-M-3) ca fiind grupul cel mai frecvent izolat din această regiune.

Atât pentru izolatele de origine animală, cât și pentru cele de origine umană, genele dominante ce codifică enzimele ESBL au aparținut grupului CTX-M-U (CTX-M-1 și CTX-M-9), 61 % pentru izolatele animale, respectiv 80% pentru cele umane. De asemenea, caracterizarea grupurilor CTX-M-U, pentru întreg lotul de izolate de *E. coli*, a semnalat prezența grupului CTX-M-1 ca fiind cel mai prevalent (61.11% la animale și 75% pentru izolatele umane). Grupul CTX-M-9 de enzime a fost identificat doar la tulpinile izolate de la porcii abatorizați (25 %). Zece (13,89%) tulpini de origine animală din totalul de 118 analizate cu semnal pozitiv pentru gena *bla*_{CTX-M-U} nu au aparținut niciunuia din cele două grupuri menționate anterior.

De asemenea, din tabelul 7.9 se observă că atât pentru izolatele animale cât și pentru izolatele umane genele *bla*_{CTX-M-U} au fost identificate fie singure, fie în combinație cu genele *bla*_{SHV} (majoritatea) sau *bla*_{TEM} (doar pentru izolatele de la porcine). Gena *bla*_{OXA} a fost identificată la o singura tulpină izolată de la porcine.

7.2.2 Prevalența tulpinilor AmpC izolate

Prezența tulpinilor de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare de AmpC constituie de asemeni o problemă emergentă atât în medicina umană cât și în medicina veterinară, cu atât mai mult cu cât prezența acestor gene este semnalată frecvent împreună cu genele ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins și de cele mai multe ori maschează fenotipic prezența ESBL-urilor.

Cele 123 de tulpini bacteriene, care s-au dezvoltat pe mediul MacConkey suplimentat cu cefotaxime (MC+CTX) utilizat pentru detecția ESBL, au avut fie fenotip ESBL, fie AmpC, fie ESBL/AmpC. Conform literaturii de specialitate, prezența fenotipului AmpC maschează de cele mai multe ori fenotipul ESBL.

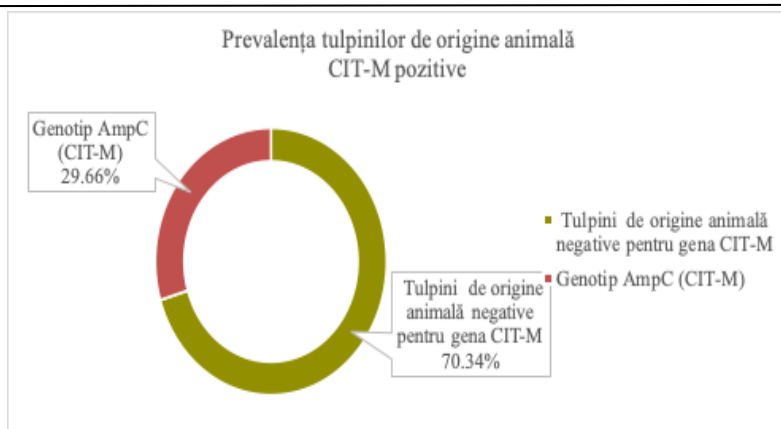


Fig. 7.13 Prevalența izolatelor de origine animală CIT-M

Fig. 7.13 Prevalence of CIT-M animal isolates

Pentru cele 118 tulpini de origine animală analizate, testele de biologie moleculară au evidențiat prezența genei *bla*_{CIT-M}, pentru 35/118 (29.66 %) tulpini (fig.7.13) iar pentru izolatele de origine umană a fost identificată 1/5 (20%) tulpini (fig. 7.14).

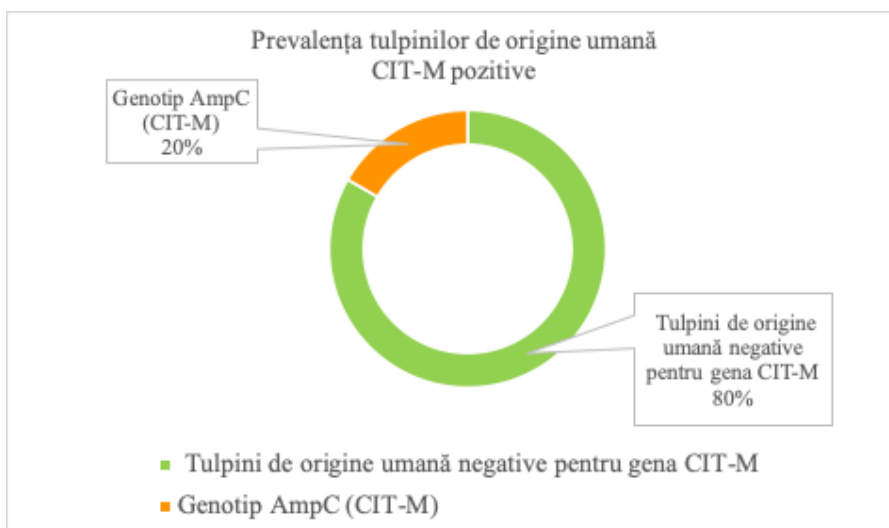


Fig. 7.14 Prevalența izolatelor de origine umană CIT-M

Fig. 7.14 Prevalence of CIT-M human isolates

7.2.3 Prevalența tulpinilor purtătoare de gene asociate cu rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone și Colistin

Acidul nalidixic a fost prima chinolonă introdusă pentru utilizare clinică la începutul anilor 1960 (Ball, 2000).

Ciprofloxacină, fluoroquinolonă cu moleculă bactericidă, cu un spectru larg de activitate *in vitro* și care este deosebit de activă împotriva bacteriilor din familia *Enterobacteriaceae*, a fost ea însăși disponibilă în clinici în anii 1980 (Paton ș.a, 1988). Conform

literaturii de specialitate, plasmidele care poartă genele ce determină rezistența la beta-lactamine pot transfera și rezistența la alte clase de antibiotice, cum ar fi fluoroquinolonele (Eftekhar ș.a., 2015).

O situație particulară o reprezintă rezistența izolatelor la colistin (polimixin), un antimicrobian considerat ca o ultimă soluție în tratamentul cu antibiotice pentru bacteriile gram-negative multidrog rezistente (RMA) (Olaitan ș.a., 2016). Colistinul nu este administrat doar în medicina umană, utilizarea sa a fost descrisă și în medicina veterinară, în dietele de fermă, unde s-a demonstrat că îmbunătățește sănătatea și promovează creșterea. Mai mult, s-a sugerat că utilizarea necontrolată a colistinului la animale a jucat un rol important în apariția rezistenței mediată de plasmide la colistin (Collignon ș.a., 2016).

Creșterea numărului de bacterii multidrog rezistente (RMA), precum și lipsa de antimicrobiene noi, au determinat medicii umani să utilizeze substanțe antimicrobiene mai vechi, cum ar fi colistinul (polimixina E). De exemplu, consumul de polimixine a crescut semnificativ în Danemarca, Ungaria și Italia în perioada 2010-2014 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015).

Din punct de vedere al importanței, în prezent colistinul este o opțiune de tratament de ultimă linie pentru infecțiile cauzate de *Enterobacteriaceae* Gram-negative producătoare de carbapenemaze (*E. coli*, *Klebsiella spp.*). Pe de altă parte, colistinul a fost utilizat pe scară largă timp de mai mulți ani în medicina veterinară și are o importanță terapeutică pentru tratamentul infecțiilor enterobacteriene la animale de rentă, cum ar fi porci, pui de carne, curci, bovine, oi, caprine și iepuri de carne (EMA, 2016).

Toate tulpinile ce au fost caracterizate molecular pentru gene ce codifică enzimele de tip ESBL, au fost testate și pentru izolarea genelor *bla_{qnrA}*, *bla_{qnrB}*, *bla_{qnrS}*, gene ce codifică rezistența la fluorochinolone (Enrofloxacin).

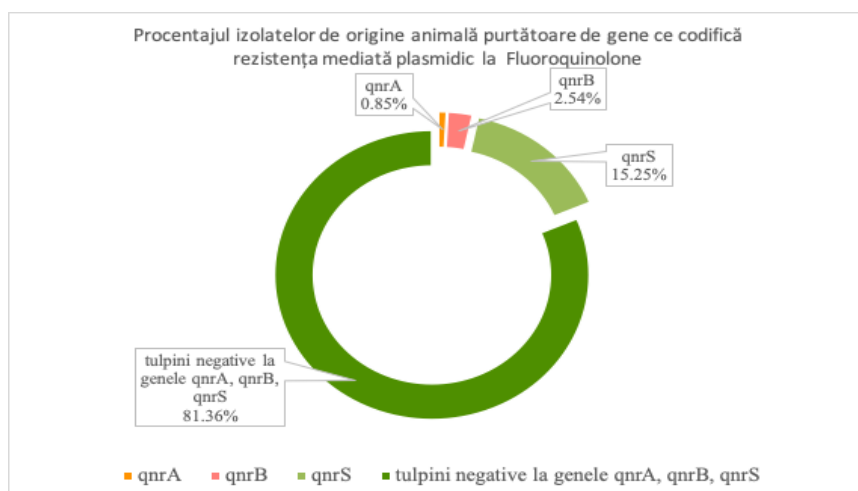


Fig.7.15 Procentajul izolatelor de origine animală purtătoare de gene ce codifică rezistența mediată plasmidică la Fluoroquinolone

Fig.7.15 Isolated percentage of animal origin carrying genes encoding plasmid mediated resistance to Fluoroquinolone

În urma testelor PCR realizate cu scopul de a caracteriza rezistența la fluoroquinolone pentru tulpinile de origine animală, 1/118 (0.85 %) a fost pozitivă pentru gena *qnrA*, 3/118 (2,54 %) au fost pozitive pentru gena *qnrB* și 18/118 (15.25 %) au fost pozitive pentru gena *qnrS* (fig.7.15).

Această asociere între tulpinile pozitive pentru genele menționate anterior cu prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins: *bla*_{CTX-M-U}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA}, a mai fost descrisă și în alte studii similare (Măciucă ș.a., 2015).

Spre deosebire de tulpinile de origine animală analizate, în cazul izolatelor umane nu a fost pusă în evidență nici o tulpină pozitivă pentru genele *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA}.

În urma investigațiilor moleculare efectuate, s-a observat că 3/118 (2.54%) tulpini de *E. coli* prezumtiv sintetizatoare ESBL/AmpC izolate de la porcii sacrificați sunt rezistente la colistin (*mcr-1*) (fig.7.16). De asemenea, nu a fost identificată nici o tulpină de origine animală pozitivă pentru gena *mcr-2* iar pentru izolatele de origine umană nu a fost identificată niciuna din cele două gene. Deși numărul de tulpini de origine animală rezistente la colistin este scăzut, rezultatele obținute sugerează practic administrarea acestui antibiotic în fermele de porci. Mai mult, tulpinile pozitive pentru gena *mcr-1* sunt caracterizate molecular și prin prezența genelor ce codifică grupul CTX-M-1 de enzime, a genelor ce codifică enzimele SHV și a genelor ce codifică rezistența mediată plasmidic la fluoroquinolone (*qnrS*), ceea ce înseamnă că aceste izolate sunt rezistente nu doar la colistin, ci și la antibiotice beta-lactamine, inclusiv la cefalosporine de generația a treia sau la fluoroquinolone.

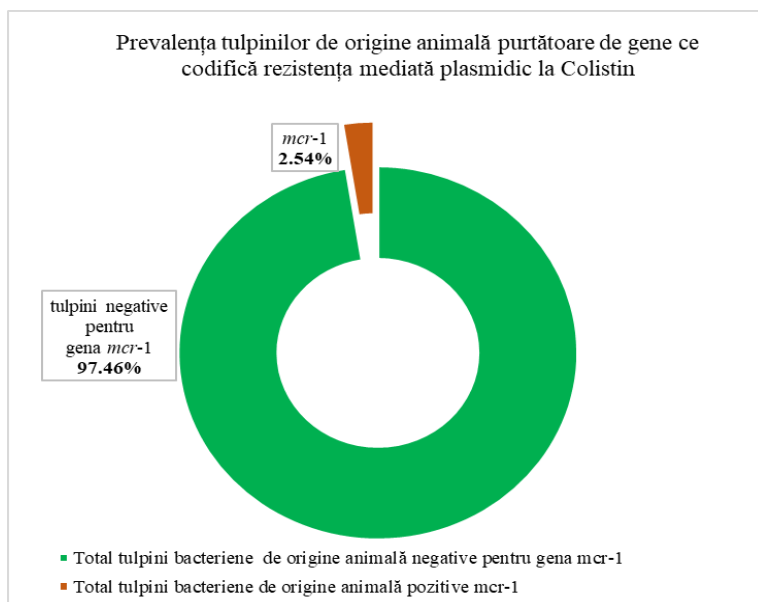


Fig.7.16 Prevalența tulpinilor de origine animală purtătoare de gene ce codifică rezistența mediată plasmidic la Colistin

Fig.7.16 Prevalence of strains of animal origin carrying genes encoding plasmid-mediated resistance to Colistin

Deși literatura de specialitate menționează că rezistența la colistin determinată de prezența genei *mcr-1* este mai ridicată, prevalența obținută de noi este mult mai scăzută, însă destul de alarmantă, colistinul aparținând antibioticelor de importanță critică pentru tratamentul infecțiilor grave la om, astfel că situația actuală trebuie evaluată cu atenție. De asemenea, studii similare realizate în regiunea de Nord-Est a țării au constatat în identificarea tulpinilor de *E. coli* izolate de la pui broiler cu identificarea portajului de gene ce codifică rezistența mediată plasmidic la colistin (*mcr-1*). Aceste investigații au avut ca rezultat evidențierea unei prevalențe crescută a acestora, respectiv 11.9% (Măciucă ș.a., 2019). Întrucât distribuția pe ruta plasmidică pare să joace un rol mai mare decât răspândirea clonală a bacteriilor portante ale genei *mcr-1*, rezultatele obținute în prezentul studiu pot fi utilizate pentru evaluarea strategiilor de intervenție constând în utilizarea prudentă a antibioticelor în creșterea animalelor precum și în medicina umană.

Liu ș.a., (2016) relatează că, în perioada 2011-2014, majoritatea speciilor de *E. coli* izolate de la animale (21%), din carne crudă (15%) și de la oameni (1%) au fost purtătoare ale genei *mcr-1*.

De fapt, studii similare au relevat faptul că prezența genelor *bla_{CTX-M-U}* și *mcr-1* pe aceeași plasmidă facilitează diseminarea tulpinilor rezistente la colistin prin presiunea selectivă odată cu administrarea colistinului precum și prin utilizarea antibioticelor non-beta-lactamice (Dandachi ș.a., 2018).

Alte studii asemănătoare, efectuate în Europa, au relevat, de asemenea, prezența tulpinilor *E. coli* ESBL/AmpC și asocierea între rezistența la antibiotice beta-lactamice și respectiv rezistența la antibiotice non-beta-lactamice (Ojer-Usoz ș.a., 2013; Stefani ș.a., 2014).

Deși numărul de tulpini izolate de la personalul din fermă și confirmate molecular ca fiind purtătoare de gene ce codifică rezistența plasmidică la beta-lactamine este mic, identificarea și caracterizarea lor genetică indică circulația activă a tulpinilor de *E. coli* ESBL în populația de origine umană, evidențiindu-se ocupația ca un potențial factor de risc în portajul acestor tip de tulpini bacteriene. Epidemiologia și mecanismele de apariție și răspândire a rezistenței antimicrobiene și a bacteriilor rezistente la antibiotice sunt diverse și există mai multe căi posibile de transmitere a lor. Literatura de specialitate (Da Costa, ș.a., 2013; Argudín, ș.a., 2017) menționează că au fost detectate aceleași subtipuri de tulpini în populația umană și a animalelor de rentă sau în populația animalelor de companie, sugerând un posibil schimb de bacterii sau gene bacteriene.

Utilizarea antibioticelor fără rețetă reprezintă o amenințare și este din ce în ce mai clar că aplicarea nepăsătoare a antimicrobienei în timpul ciclului de producție poate amplifica apariția bacteriilor rezistente în ferme, în special în perioada de „creștere”, imediat după înțărare. Presiunea selectivă cauzată de consumul de antibiotice se adaugă la apariția și răspândirea rezistenței bacteriene; în acest sens, porcii sunt considerați ca o sursă potențială de bacterii rezistente (Burow ș.a., 2014). Sinteza rezultatelor obținute în urma analizei PCR a lotului de tulpini investigate, este prezentată în tabelul 7.11.

Rezultatele obținute la testarea PCR pentru tulpinile ESBL/AmpC incluse în studiu
Results obtained in PCR testing for ESBL / AmpC strains included in the study

Nr. Crt	Cod proba	FENOTIP	CTX-M-U	CTX-M-1	CTX-M-9	TEM	SHV	OXA	CIT-M	qnr A	qnrB	qnrS	mcr-1	mcr-2
1	BT1	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	BT2	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	BT3	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnrS	mcr-1	-
4	BT4	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	BT5	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	qnrS	-	-
6	BT6	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	SHV	-	-	-	-	qnrS	-	-
7	BT7	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	BT8	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	BT9	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnrS	mcr-1	-
10	BT10	ESBL/AmpC	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	mcr-1	-
11	BT11	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	BT12	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	qnrS	-	-
13	BT13	ESBL	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
14	BT14	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	qnrS	-	-
15	BT15	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	BT16	ESBL	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
17	BT17	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	BT18	ESBL	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
19	BT19	ESBL/AmpC	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	BT20	ESBL/AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
21	BT21	ESBL/AmpC	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	BT22	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	BT23	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	IS1	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	qnr S	-	-
25	IS2	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
26	IS3	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-

Nr. Crt	Cod proba	FENOTIP	CTX-M-U	CTX-M-1	CTX-M-9	TEM	SHV	OXA	CIT-M	qnr A	qnrB	qnrS	mcr-1	mcr-2
27	IS4	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
28	IS5	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
29	IS6	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	IS7	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
31	IS8	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
32	IS9	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
33	IS10	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
34	IS11	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
35	IS12	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	IS13	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	IS14	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	IS15	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
39	IS16	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
40	IS17	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
41	IS18	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
42	IS19	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
43	IS20	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
44	IS21	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
45	IS22	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
46	IS23	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
47	IS24	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
48	IS25	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
49	IS26	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
50	IS27	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
51	IS28	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
52	IS29	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
53	IS30	ESL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	IS31	ESBL/AmpC	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	IS32	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pasat Marinela

Nr. Crt	Cod proba	FENOTIP	CTX-M-U	CTX-M-1	CTX-M-9	TEM	SHV	OXA	CIT-M	qnr A	qnrB	qnrS	mcr-1	mcr-2
56	IS33	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	IS34	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
58	IS35	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
59	IS36	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	IS37	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
61	IS38	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
62	IS39	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
63	IS40	ESBL	CTX-M-U	-	-	TEM	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
64	IS41	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
65	IS42	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	qnr B	-	-	-
66	IS43	AmpC	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	-	-	-
67	IS44	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	IS45	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
69	IS46	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
70	IS47	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	IS48	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	IS49	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	OXA	-	-	-	-	-	-
73	IS50	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	IS51	ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	IS52	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	IS53	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
77	IS54	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	qnr B	-	-	-
78	IS55	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
79	IS56	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
80	IS57	AmpC	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	CIT-M	-	-	-	-	-
81	SV1	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
82	SV2	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
83	SV3	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
84	SV4	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-

Nr. Crt	Cod proba	FENOTIP	CTX-M-U	CTX-M-1	CTX-M-9	TEM	SHV	OXA	CIT-M	qnr A	qnrB	qnrS	mcr-1	mcr-2
85	SV5	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
86	SV6	ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	SV7	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
88	SV8	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	SV9	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
90	SV10	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
91	SV11	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
92	SV12	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
93	SV13	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
94	SV14	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
95	SV15	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
96	SV16	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
97	SV17	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
98	SV18	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
99	SV19	ESBL	CTX-M-U	-	CTX-M-9	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
100	SV20	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	SV21	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
102	SV22	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
103	SV23	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
104	SV24	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
105	SV25	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
106	BT24	ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	qnr S	-	-
107	BT25	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
108	BT26	ESBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	BT27	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
110	BT28	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	BT29	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
112	BT30	ESBL	-	-	-	-	-	-	CIT-M	-	-	qnr S	-	-
113	BT31	ESBL	CTX-M-U	-	-	TEM	-	-	-	qnr	-	-	-	-

Pasat Marinela

Nr. Crt	Cod proba	FENOTIP	CTX-M-U	CTX-M-1	CTX-M-9	TEM	SHV	OXA	CIT-M	qnr A	qnrB	qnrS	mcr-1	mcr-2
										A				
114	BT32	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	qnr S	-	-
115	BT33	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	-	-	-	-	-	-
116	IS58	ESBL	-	-	-	-			-	-	-	qnr S	-	-
117	IS59	ESBL	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-
118	IS60	ESBL	CTX-M-U	-	-	-			-	-	qnr B	-	-	-
119	om/IO V.	AmpC	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	SHV	-	CIT-M	-	-	-	-	-
120	om/BO C.	ESBL	CTX-M-U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121	om/ E.C. O127	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
122	om/ E.C. 732	AmpC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	om/ E.C. A 727	ESBL	CTX-M-U	CTX-M-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7.2.4 Rezultate și discuții privind încadrarea tulpinilor de *E. coli* în grupuri filogenetice

Printre agenții patogeni oportuniști, *E. coli*, atât comensală cât și patogenă, este un model deosebit de interesant prin frecvența și responsabilitatea sa în apariția infecțiilor comunitare și nosocomiale, intra și extraintestinale (precum tractul urinar, infecții septicemice, meningite și pneumonii la om și animale) cât și prin cunoștințele acumulate pe acest model bacterian în ceea ce privește filogenia și structura populației de bacterii (Touchon ș.a., 2009).

Din aceste motive, *E. coli* este candidatul ideal pentru a studia tranziția dintre comensalism și patogenitate oportunistă (Pinheiro ș.a., 2007) sau chiar modul în care legătura dintre o bacterie și gazda sa poate fluctua între mutualism, comensalism, patogenează oportunistă sau patogenează specifică.

E. coli este una dintre cele mai versatile specii bacteriene, alternând între habitatul său primar, intestinul vertebratelor, unde ea trăiește ca un comensal (Tenaillon ș.a., 2010) și habitat secundar, apa și sedimentele (Savageau, 1983). Poate să funcționeze ca agent patogen intra- și extraintestinal la oameni și alte specii de animale (Kaper ș.a., 2004).

Această diversitate a stilurilor de viață se realizează printr-un grad ridicat de plasticitate a genomului, cu pierderi și câștiguri de gene, prin transfer orizontal (Rasko ș.a., 2008; Touchon ș.a., 2009). *E. coli* are un genom de bază aproximativ de 2200 de gene, dar continuă să rămână un model deschis de pangenom cu un rezervor de peste 13.000 de gene. (Rasko ș.a., 2008; Touchon ș.a., 2009). Astfel, diversele fenotipuri observate rezultă în principal dintr-un număr mare de combinații de gene diferite.

Majoritatea tulpinilor de *E. coli* sunt comensale inofensive din intestinalele oamenilor și animalelor, unde constituie o proporție mare din microbiota anaerobă facultativă (Tenaillon ș.a., 2010; Herrero-Fresno ș.a., 2015).

Mai multe studii au arătat că tulpinile patogene de *E. coli* pot fi derivate din tulpini comensale prin achiziționarea de operoni cromozomiali sau de virulență extracromozomală (Johnson ș.a., 2001; Johnson ș.a., 2003; Finlay ș.a., 1997).

Aplicând regulile de determinare pentru identificarea grupărilor filogenetice, tulpinile de *E. coli* sunt clasificate în patru grupuri filogenetice principale: A, B1, B2 și D (Selander ș.a., 1987; Herzer ș.a., 1990). A și B1 sunt asociate cu bacteriile comensale și celelalte 2 grupuri B2 și D, care au fost asociate mai frecvent cu infecțiile extraintestinale (Bingen ș.a., 1998; Picard ș.a., 1999; Johnson ș.a., 2000).

Deși determinanții de virulență sunt considerați a fi mobili, a fost raportată o legătură între filogenia tulpinii și virulență. Tulpinile extraintestinale virulente aparțin în principal grupului B2 și într-o măsură mai mică, grupului D, în timp ce majoritatea tulpinilor comensale aparțin grupelor A și B1. Johnson și colaboratorii, au constatat că tulpinile din filogrupurile B2 și D conțin mai mulți factori de virulență decât tulpinile din filo-grupele A și B1. (Johnson ș.a., 2007; Duriez ș.a., 2001; Boyd, ș.a., 1998).

Este cunoscută legătura dintre gradul de virulență al unei tulpini și filogrupul genetic din care face parte și de aceea, din acest punct de vedere, este importantă încadrarea

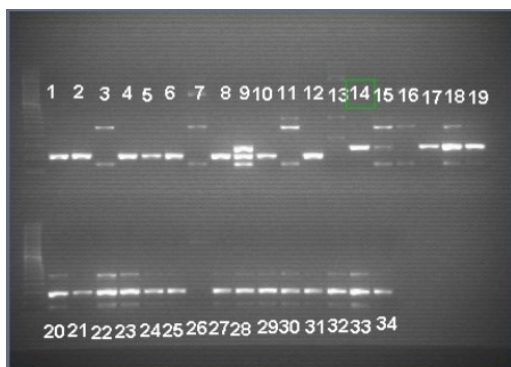
tulpinilor de *E. coli* izolate într-un anumit filogrup prin PCR simplex, interpretat după schema lui Clermont (Clermont ș.a., 2000).

Grupurile filogenetice ale izolatelor noastre de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze (ESBL și AmpC) au fost determinate conform metodei PCR multiplex dezvoltată de Clermont (Clermont ș.a., 2000) (fig. 7.5). Analiza filogenică a arătat că toate tulpinile de *E. coli* se încadrează în cele 4 grupuri filogenetice principale: A, B1, B2 și D, conform combinației a trei markeri genetici: gena *ChuA* (implicată în transportul grupului hem), gena *yjaA* (implicată în răspunsul celular la peroxidul de hidrogen) și fragmentul de ADN *TspE4.C2* (care conține o genă putativă pentru esteraza lipazei 909, 921 sau 984bp în funcție de tulpină) (Clermont ș.a., 2000; Cherry Lee, 2011; Gordon ș.a., 2008).

Tabelul 7.12/Table 7.12

Filogrupurile identificate la izolatele de *E. coli*
Phylogroups identify *E. coli* isolates

Filogrup	Nr de izolate/ grup	
	Porc n=118	Om n=5
A	37/118 (31.24%)	2/5 (40%)
B1	25/118 (21.18 %)	0
B2	20/118 (16.94%)	2/5 (40%)
D	23/118 (19.49%)	0
Neidentificat	13/118 (11.15%)	1 (20%)

Fig. 7.17 Rezultatele testării prin PCR pentru genele *ChuA*, *YjaA*, *TspE4.C2*Fig. 7.17 PCR test results for *ChuA*, *YjaA*, *TspE4.C2* genes

Colecția noastră de izolate a constat în 123 tulpini de *E. coli* (din care 118 de la suine și 5 de la personalul din fermă), toate fiind analizate prin PCR. După analiza filogenetică, tulpinile de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) au fost încadrate în toate cele 4 grupuri. În urma analizei PCR, tulpinile de *E. coli* ESBL au fost atribuite în principal grupului filogenetic A, 37/118 (31.24%), filogrupului B1, 25/118 (21.18 %), urmate de filogrupul D, 23/118 (19.49%) și filogrupul B, 22/118 (16.94%). Alte 13/118 (11.15%) sunt tulpini neîncadrate (fig. 7.17, fig. 7.18, fig. 7.19, tab.7.12).

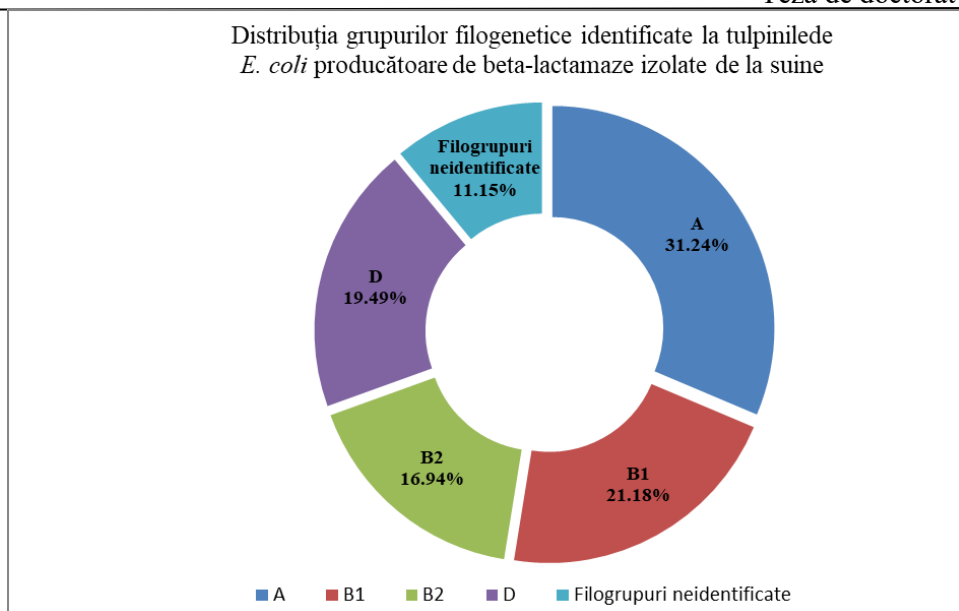


Fig.7.18 Distribuția grupurilor filogenetice între tulpinile de *E. coli* producătoare beta-lactamaze izolate de la suine

Fig.7.18 Distribution of phylogenetic groups among *E. coli* strains producing beta-lactamases isolated from pigs

Se poate observa că pentru izolatele de la suine, proporția de 52,42 % a tulpinilor comensale (A, B1) este mai mare decât proporția tulpinilor extraintestinale (B2, D), care este de 36.43%. În concluzie, deoarece nu există o diferență considerabilă între procentul tulpinilor patogene și cel al tulpinilor comensale, putem menționa că în cadrul fermelor de unde au fost abatorizate suinele luate în acest studiu, cele două tipuri de tulpini evoluează concomitent.

E. coli este un locuitor comensal al tractului gastrointestinal la oameni și, de asemenea, poate provoca diverse boli intestinale și extraintestinale (Donnenberg, 2002). Tulpinile care provoacă infecții conțin numeroși factori de virulență codificați de plasmide, bacteriofagi sau cromozomul bacterian. (Donnenberg, 2002)

În cazul tulpinilor umane, filogrupurile detectate au fost A și B2, în procente egale de 40% iar filogrupurile B1 și D nu au fost identificate. De asemenea, din cele 5 tulpini de origine umană analizate, una (20%) nu a aparținut niciunui filogrup. Dacă luăm în considerare izolatele de la personalul din fermă, grupul filogenetic B2 a fost detectat în tulpinile *E. coli* ESBL izolate din fecalele persoanelor clinic sănătoase și nu de la persoane cu semne clinice de boală. (fig. 7.19).

Raportarea rezultatelor privind filogrupurile identificate în funcție de fenotipul tulpinilor de *E. coli* (ESBL, ESBL/AmpC, AmpC) de origine animală a pus în evidență faptul că, pentru fenotipul ESBL, distribuția în cadrul filogrupurilor este relativ similară, cu diferențe aproape nesemnificative între filogrupurile A (n=11), B1 (n=19), B2 (n=18) și D (n=22). De asemenea, pentru fenotipul ESBL/AmpC au fost identificate doar grupurile A (n=3) și B2 (n=2), în timp ce pentru fenotipul AmpC majoritar a fost filogrupul A

(n=23), urmat de B1 (n=6) și D (n=1). Pentru cele 13 tulpini care nu au aparținut niciunui filogrup, 8 au fost cu fenotip AmpC și 5 cu fenotip ESBL(fig.7.20).

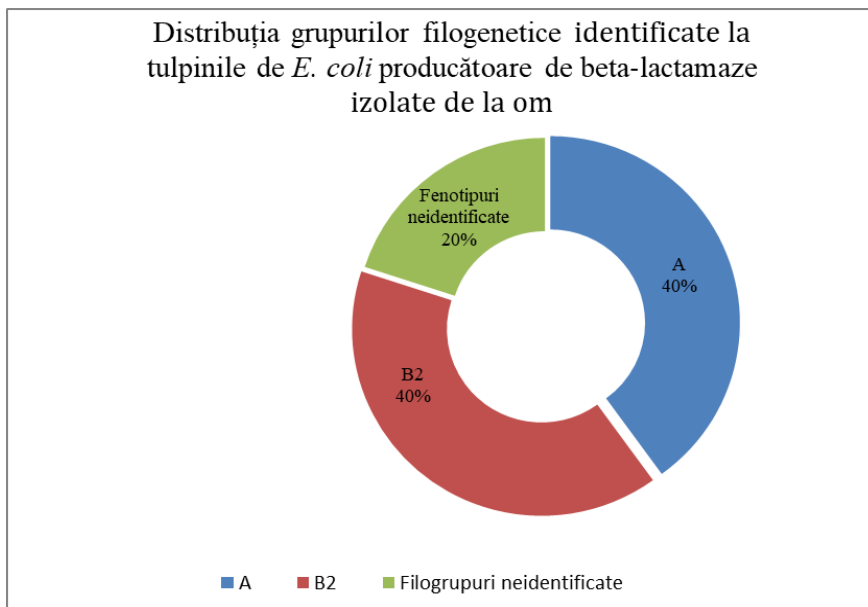


Fig.7.19 Distribuția grupurilor filogenetice între tulpinile de *E. coli* producătoare beta-lactamaze din izolatele umane

Fig.7.19 Distribution of phylogenetic groups among *E. coli* strains producing beta-lactamases from human isolates

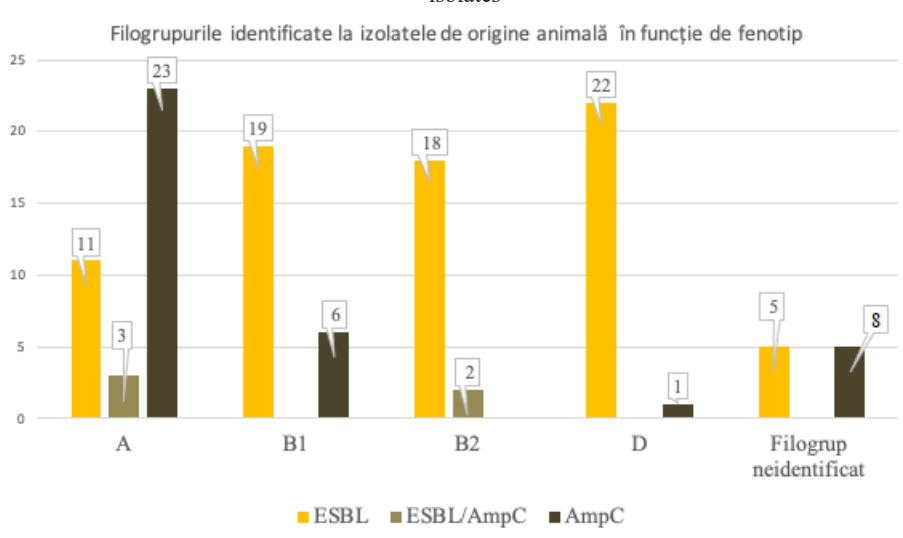


Fig. 7.20 Distribuția filogrupurilor identificate la izolatele de origine animală în funcție de fenotip

Fig. 7.20 Distribution of identified phylogroups to animal isolates by phenotype

Față de tulpinile comensale care fac parte din filogrupurile A și B1, tulpinile de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC din filogrupurile B2 și D au un pronunțat caracter zoo-

notic, o patogenitate crescută, rezistență la antibiotice, fiind o permanentă amenințare pentru sănătatea animalelor precum și sănătatea publică.

În ceea ce privește distribuția filogrupurilor în funcție de fenotip, în cadrul colecției de *E. coli* de origine umană, în filogrupul A a fost încadrată o tulpină cu fenotip ESBL și una cu fenotip AmpC iar din filogrupul B2, două izolate au avut fenotip ESBL și una fenotip AmpC. De asemenea, tulpina de origine umană pentru care nu s-a identificat filogrupul are fenotip AmpC (fig. 7.21).

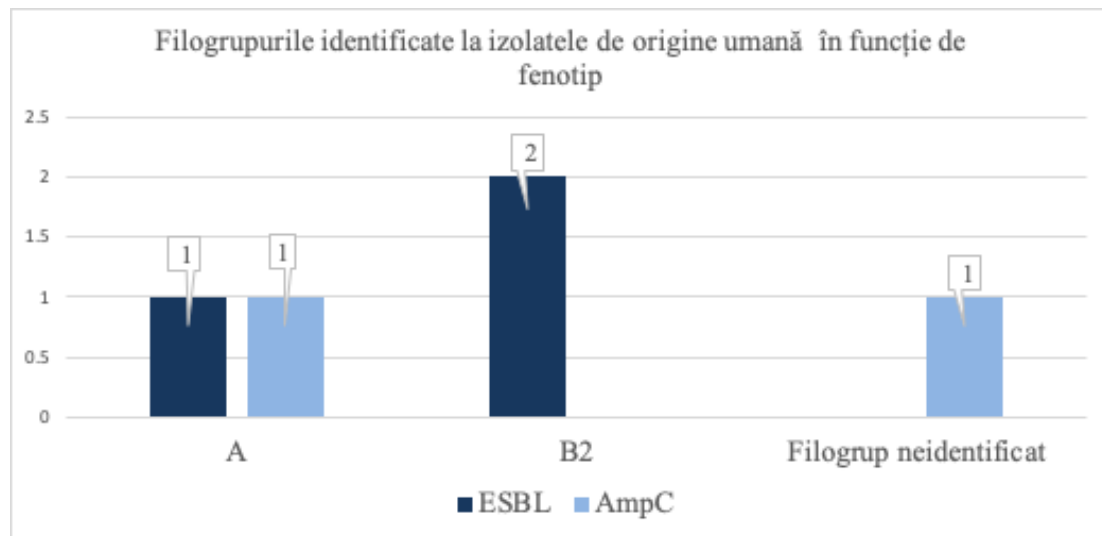


Fig. 7.21 Distribuția filogrupurilor identificate la izolatele de origine umană în funcție de fenotip

Fig. 7.21 Distribution of identified phylogroups to isolates of human origin by phenotype

Aceste dovezi sugerează că izolatele de *E. coli* patogene oportuniste identificate în ferme au potențial zoonotic și pot infecta oamenii (Cornick și Vukhac, 2008; Trotz-Williams ș.a., 2012). Prin urmare, este important să înțelegem modurile de transmitere a acestor tulpini zoonotice, pentru a reduce riscul de propagare prin lanțul de producție către populație.

7.3. Concluzii parțiale

1. La izolatele de origine animală studiate de noi, genotipul cel mai frecvent a fost ESBL CTX-M, predominant fiind grupul de enzime CTX-M-1(61.11%). La izolatele de origine umană, a fost identificat doar grupul de gene bla_{CTX-M-1}.
2. Dacă raportăm rezultatele obținute de noi la cele existente în partea de est a Europei, acestea sunt similare cu cele din literatura de specialitate, care menționează grupul de enzime CTX-M-1 (CTX-M-15; CTX-M-3) ca fiind grupul cel mai frecvent izolat din această regiune.
3. Investigațiile realizate pentru identificarea grupurilor de enzime TEM, SHV și OXA la tulpinile de origine animală, au pus în evidență că grupul dominant este SHV (37.28%).
4. Gena SHV a fost identificată la o singură tulpină izolată de la om, în timp ce ge-

nele TEM și OXA nu au fost identificate la nici un izolat.

5. Deși numărul de tulpini de origine umană analizate este mic, identificarea genelor ce codifică enzimele ESBL confirmă prezența acestor enzime în populația autohtonă de tulpini de *E. coli* de origine umană.
6. Prevalența crescută a tulpinilor de *E. coli* purtătoare de gene ce codifică enzimele ESBL provenite de la suinele abatorizate sugerează că utilizarea excesivă a antimicrobienelor și utilizarea inadecvată a cefalosporinelor în producția animalieră favorizează sau poate fi asociată cu apariția acestor tulpini la animale. De asemenea, prin intermediul alimentelor (crude sau insuficient preparate termic), sau prin contactul direct, există posibilitatea de transmitere a acestor tulpini de la animale la om.
7. Tulpinile testate molecular pentru identificarea principalului grup de gene CIT-M ce codifică enzimele AmpC, au fost identificate atât la animale, în proporție de 29.66% cât și la om, în procent de 20%.
8. Rezultatele obținute de noi pentru identificarea spectrului de gene *bla*_{CTX-M-U} în populația de *E. coli* de origine umană sunt în concordanță cu rezultatele altor studii realizate în România pe tulpini de enterobacterii ESBL pozitive de origine umană.
9. Conform rezultatelor acestui studiu, o parte din izolatele producătoare de ESBL și/sau AmpC fac parte din grupurile B2 (16.94%) și D (19.49%), care sunt asociate cu tulpini de *E. coli* cu o patogenitate crescută.
10. Față de tulpinile comensale care fac parte din filogrupurile A și B1, tulpinile de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC din filogrupurile B2 și D au un pronunțat caracter zoonotic, o patogenitate crescută și rezistență la antibiotice, fiind o permanentă amenințare pentru sănătatea animalelor precum și pentru sănătatea publică.
11. Prin urmare, este important să înțelegem modurile de transmitere a acestor tulpini zoonotice, pentru a reduce riscul de propagare prin lanțul de producție alimentară către populație.
12. Tulpinile producătoare de ESBL confirmate molecular au fost pozitive și la markerii de rezistență la alte clase de antibiotice, cum ar fi fluoroquinolonele.
13. Prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins în tulpinile de *E. coli* de origine animală confirmă utilizarea în fermele de porcine a antibioticelor din categoria beta-lactaminelor sau a fluoroquinolonelor.
14. Studiul realizat de noi, privind caracterizarea substratului molecular al tulpinilor de *E. coli* ESBL pozitive izolate de la porcii abatorizați, este primul de acest fel realizat în regiunea de nord-est a României.
15. Rezultatele obținute în prezentul studiu pot fi utilizate pentru evaluarea strategiilor de intervenție privind utilizarea prudentă a antibioticelor în creșterea animalelor precum și în medicina umană.

CAPITOLUL 8. ANALIZA FILOGENETICĂ A GENELOR CE CODIFICĂ ENZIMELE ESBL IDENTIFICATE LA TULPINILE DE *E. COLI*

CHAPTER 8. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF GENES CODING ESBL ENZYMES IDENTIFIED IN *E. COLI* STEMS

Contribuții majore la monitorizarea răspândirii genelor ESBL, între diferite specii, au fost realizate prin utilizarea, alături de testarea tradițională fenotipică, a metodelor de diagnostic molecular, precum PCR și secvențierea Sanger, care vizează genele ESBL. Mai mult decât atât, avansul tehnologiei de secvențiere și facilitarea diseminării rezultatelor prin baze de date privind suportul genetic al rezistenței antimicrobiene, au condus la promovarea analizei genelor implicate în RAM în diverse izolate.

8.1. Material și metodă de lucru

Secvențierea ampliconilor. Ampliconii au fost purificați cu kitul de purificare PCR Qiaquick (Qiagen), conform protocolului specificat de producător. Secvențierea, în ambele sensuri, a fost efectuată în cadrul MacroGen Europe B.V

În urma analizei produșilor de amplificare obținuți, au fost selectate 21 de tulpini pentru a fi secvențiate. Secvențierea a fost realizată prin tehnica Sanger, fiind externalizată către MacroGen Europa. Pentru a realiza încadrarea în grupurile de enzime beta-lactamaze cu spectru extins – de tip CTX-M, fiecare secvență nucleotidică obținută a fost analizată individual, din punct de vedere bioinformatic. În urma analizei cromatogramelor, secvențele curățate au fost introduse în platforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a National Center for Biotechnology Information (NCBI), pentru compararea cu alte secvențe din această bază informatică.

8.2. Rezultate și discuții

Au fost secvențiate selectiv un total de 21 tulpini de *E. coli* caracterizate molecular prin prezența genelor ce codifică enzimele CTX-M, 17 de origine animală și 4 de origine umană.

În urma analizei izolatelor de origine animală, s-a observat faptul că 11/17 (64.7%) tulpini sunt purtătoare ale genei *bla*_{CTX-M-1}, iar genele *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-8} și *bla*_{CTX-M-9} au fost identificate în câte o tulpină analizată.

Rezultatele secvențierii produșilor PCR obținuți în urma amplificării pentru genele ce codifică enzimele CTX-MU, CTX-M1, CTX-M9

Sequencing results of the PCR products obtained after amplification of the regions encoding the CTX-MU, CTX-M1, CTX-M9 enzymes

Nr. probă	Nr. identificare tulpină	PCR (amorse)	Rezultat secvențiere
1	BT6	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
2	BT22	CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
3	BT23	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
4	IS32	CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
5	IS33	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
6	IS40	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-8}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-8}
7	BT31	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
8	IS60	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
9	OM SP. BO.I	CTX-MU1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-MU1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
10	BT3	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
11	BT10	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
12	BT11	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
13	IS49	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
14	IS56	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-3}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-3}
15	BT32	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
16	OM IO.V.	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
17	OM EC. O127	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}

Nr. probă	Nr. identificare tulpină	PCR (amorse)	Rezultat secvențiere
18	OM EC. A727	CTX-M1 F	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
		CTX-M1 R	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
19	SV20	CTX-M9 F	<i>bla</i> _{CTX-M-14}
		CTX-M9 R	<i>bla</i> _{CTX-M-14}
20	BT21	CTX-MU1 F	Fără rezultat
		CTX-MU1 R	
21	BT9	CTX-M1 F	Fără rezultat
		CTX-M-1 R	

Pentru 2 tulpini nu s-au obținut rezultate în urma secvențierii. De asemenea, pentru două tulpini izolate de la suine, BT13 și C133, numai secvența anti-sens a putut fi analizată. În rândul izolatelor de origine umană, la toate cele 4 tulpini secvențiate s-a identificat gena *bla*_{CTX-M-1} (fig.8.1).

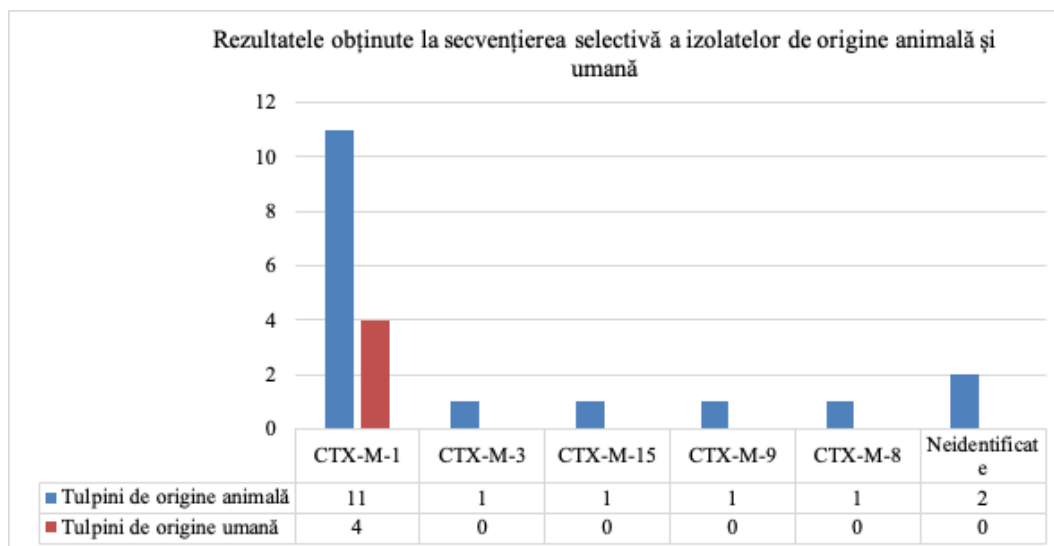


Fig. 8.1 Rezultatele obținute la secvențierea selectivă a izolatelor de origine animală și umană

Fig. 8.1 Results obtained at the selective sequencing of isolates of animal and human origin

La nivel global, cu diferențe geografice în distribuția variantelor CTX-M, au fost semnalate din ce în ce mai frecvent tulpini ESBL, în special tulpini CTX-M-1, CTX-M-14, TEM-52 și/sau SHV-12, identificate la izolatele de *E. coli* de la animalele de rentă sau din produsele alimentare (Ewers ș.a., 2012).

Până în prezent, pe baza unor similitudini ale aminoacizilor, au fost recunoscute cinci grupuri CTX-M (CTX-M-1, -2, -8, -9 și -25), fiecare incluzând mai multe variante. De exemplu, în Danemarca, CTX-M-1 (66%) și CTX-M-14 (7%) sunt variantele ESBL cel mai des raportate la tulpinile izolate de la porcii danezi (Agerșo ș.a, 2012). Din grupul CTX-M-9, CTX-M-14 este singura genă de rezistență asociată cu porcii danezi, iar la ni-

vel global, la porci, au mai fost identificate doar câteva variante suplimentare (CTX-M-9, -27, -65 și -98) (Zheng ș.a., 2012; Tamang ș.a., 2013; Liu ș.a., 2018).

Gena *bla*_{CTX-M-1}, predominantă și în studiul nostru, este cea mai frecvent implicată în apariția antibioretistenței prin mecanismul enzimelor ESBL la porcii abatorizați, în Europa (Mesa ș.a., 2006; Ewers ș.a., 2012; Hammerum ș.a., 2014; Schmithausen ș.a., 2015).

Deși gena *bla*_{CTX-M-15}, respectiv *bla*_{CTX-M-14} sunt cel mai frecvent implicate în determinarea antibioretistenței enterobacteriilor de origine umană și animală, conform literaturii de specialitate, gena *bla*_{CTX-M-15} este mai rar asociată apariției rezistenței prin ESBL la porci, în Europa, fiind mai frecvent raportată în Asia (Liu ș.a., 2018).

În România, într-un alt studiu realizat pe izolate de la pui ce proveneau din aceeași zonă de studiu (nord-estul țării), gena *bla*_{CTX-M-15} a fost cea mai prevalentă din grupul CTX-M-1, urmată de gena *bla*_{CTX-M-3} și *bla*_{CTX-M-1} iar din grupul CTX-M-9 a fost identificată doar gena *bla*_{CTX-M-14} (Măciucă ș.a., 2015).

După Song ș.a. (2020), izolatele de *E. coli* de la porci, ce conțin gena *bla*_{CTX-M-3}, sunt identificate cu o frecvență redusă, fapt observat și în studiul nostru.

Informațiile privind distribuția genei *bla*_{CTX-M-8} sunt puține la nivel global. În general, această genă este raportată cu o frecvență scăzută. În Japonia a fost raportat un studiu care s-a axat pe caracterizarea genei *bla*_{CTX-M-8}, identificată la tulpini de *E. coli* izolate de la pacienți umani și din carnea de pui (Norizuki ș.a., 2017).

De asemenea, în Filipine, gena *bla*_{CTX-M-8} a fost identificată cu o prevalență foarte scăzută la izolatele de *E. coli* de la pui (Gundran ș.a., 2019). În Brazilia, CTX-M-8 a fost implicată în infecții nosocomiale cu *Enterobacter aerogenes* și *Enterobacter cloacae*. În Europa (Spania), gena *bla*_{CTX-M-8} a fost identificată la tulpini de *E. coli* izolate de la pescăruși (Stedt ș.a., 2015).

De asemenea, la nivel național, gena *bla*_{CTX-M-8} nu a fost identificată în celelalte două studii realizate pe izolate de la pui și de la animale de companie, tot în zona de Nord-Est a României, aceste cercetări fiind singurele de o amploare mai mare, care s-au realizat în sfera medicinei veterinare în România (Măciucă, 2014; Cozma, 2017).

Concluzionăm astfel că rezistența mediata plasmidic la cefalosporinele de generația a 3-a are un substrat genetic divers, cele mai multe gene identificate în studiul nostru fiind *bla*_{CTX-M-1}.

8.3 Concluzii parțiale

1. Gena *bla*_{CTX-M-1} a fost predominantă în determinarea rezistenței mediate plasmidic la cefalosporine de generația a 3-a, la izolatele de *E. coli* de la porci abatorizați.

2. Gena *bla*_{CTX-M-8}, care a fost semnalată rar în literatura de specialitate, a fost identificată în lotul nostru de tulpini de la porci abatorizați, aceasta constituind prima raportare în România.

3. Rezultatele obținute confirmă datele din literatura de specialitate cu privire la fenomenul de antibioretistență prin mecanismele ESBL, la porci abatorizați.

4. Rezultatele secvențierii selective a izolatelor de *E. coli* de origine umană au pus în evidență prezența genei *bla*_{CTX-M-1} la tulpinile de *E. coli* izolate din materiile fecale ale personalului clinic sănătos din abator, aspect ce subliniază riscul zoonotic existent privind transmiterea tulpinilor sintetizatoare de ESBL.

CAPITOLUL 9. CONCLUZII FINALE

CHAPTER 9. FINAL CONCLUSIONS

Această lucrare a avut ca scop investigarea, izolarea și caracterizarea tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de ESBL/AmpC în probe de origine animală (suine) și umană. În urma îndeplinirii obiectivelor propuse pot fi formulate următoarele concluzii finale:

1. Dintr-un total de 232 de probe (200 de origine animală și 32 de origine umană) cultivate pe mediu agar MacConkey suplimentat cu cefotaxim (MC+CTX), la mai mult de jumătate dintre acestea (53.02%) **au fost identificate și izolate tulpini de *E. coli* prezumtiv ESBL/AmpC.**
2. Prevalența crescută a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC (59%) izolate din probele recoltate de la suine abatorizate, sugerează **utilizarea intensă și neadecvată a cefalosporinelor** în sistemele de creștere intensivă a animalelor.
3. Prevalența tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC izolate din probele de origine umană (15,62%) evidențiază **posibila transmitere interspecifică a antibioretistenței și pericolul pentru sănătatea publică.**
4. Fenotipul de rezistență majoritar identificat a fost cel **ESBL**, având o prevalență de 65.25% pentru izolatele de *E. coli* din probele de origine animală și de 60% pentru izolatele de origine umană. Prevalența tulpinilor cu fenotipul **AmpC** a fost de 30.50% la animale, respectiv 20% în probele de origine umană. Fenotipul mixt, de tip **ESBL+AmpC** a fost detectat la 4.23% dintre probele de origine animală și respectiv în 20% dintre probele de origine umană.
5. Analiza tulpinilor izolate în ceea ce privește **rezistența la principalele grupe de antibiotice** a evidențiat prezența de izolate *E. coli* rezistente la peniciline beta-lactamice, sulfamide, fluorochinolone, fenicoli, aminoglicozide, macrolide și polipeptidiceclice.
6. **Rezistența multiplă la antibiotice (RMA)** a fost evaluată pentru toate tulpinile izolate (n=123), înregistrându-se un procent ridicat de izolate RMA, respectiv 46.6% pentru tulpinile de origine animală și 40% pentru cele de origine umană.
7. Tulpinile ESBL/AmpC izolate și confirmate au fost rezistente la ampicilină (100%), urmate de sulfomethoxazol (81.36%), trimethoprim (64.41%), acid nalidixic (62,71%)

- și ciprofloxacin (55.93%). **Se confirmă astfel gama largă de antibiotice utilizate** cu scopul menținerii sănătății animale, fără a lua în calcul implicațiile pe termen lung asupra caracterelor genetice ce codifică rezistența antimicrobiană a bacteriilor.
8. Toate tulpinile izolate au fost identificate ca fiind sensibile pentru antibioticele din clasa **carbapenemelor și glicilciclinelor** (tigeciclina), concluzionându-se astfel că acestea **nu sunt utilizate în terapia uzuală** a animalelor de fermă, rămânând ca medicamente de rezervă pentru terapia umană.
 9. Monitorizarea și caracterizarea fenotipică a rezistenței la antibioticele non-beta-lactamice și beta-lactamice pentru izolatele de *Escherichia coli* prezumtiv sintetizatoare de ESBL și/sau AmpC oferă **informații epidemiologice utile** asupra rezervoarelor diferitelor tulpini posesoare de gene de rezistență circulante în populația animală sau umană.
 10. Caracterizarea substratului molecular pentru rezistența tulpinilor de *Escherichia coli* mediată plasmidic la cefalosporine de generația a treia a evidențiat preponderența genelor **CTX-M-1 și SHV**. Astfel, pentru **tulpinile de origine animală**, prevalența genelor CTX-M-1 a fost de 61.11% iar pentru genele SHV a fost de 37.28%. La **tulpinile de origine umană**, predominant a fost grupul de gene CTX-M-1 (75%), urmat de SHV (20%). Genele **TEM și OXA** nu au fost identificate la niciunul dintre izolatele de *E. coli*.
 11. În urma testării moleculare a tulpinilor ESBL/AmpC, principalul grup de gene **CIT-M** (ce codifică AmpC beta-lactamazele) a fost identificat atât la **animale** (29.66%) cât și la **om** (20%), confirmând astfel **posibilitatea transmiterii interspecifice și caracterul zoonotic** al fenomenului.
 12. Gena **bla_{CTX-M-1}**, predominantă în determinarea rezistenței mediată plasmidic la cefalosporine de generația a 3-a, a fost identificată la tulpinile de *E. coli* izolate atât din probe de origine animală, cât și de origine umană, rezultat ce susține **circulația și posibilitatea transmiterii interspecifice** a tulpinilor bacteriene antibiorezistente de *Escherichia coli* ESBL.
 13. Gena **bla_{CTX-M-8}**, care este întâlnită rar, **a fost identificată și raportată pentru prima dată** în regiunea de Est a României, fiind prezentă la tulpini de *E. coli* izolate de la porci abatorizați. Acest fapt evidențiază **riscul posibil de transmitere orizontală** de noi gene de rezistență de la animale la om.
 14. Detecția prin metode moleculare a genelor qnrS (15.25%), qnrB (2.54%) și qnrA (0.85%) la tulpinile de *E. coli* producătoare de ESBL/AmpC izolate din probele de

origine animală indică **utilizarea necorespunzătoare a fluoroquinolonelor** în cadrul filierei de creștere intensivă a suinelor.

15. Gena *mcr-1*, predominant implicată în determinarea rezistenței mediată plasmidic la colistin, a fost identificată la 2,54% din tulpinile de *E. coli* izolate din probele de origine suină. **Colistinel** este considerat un antibiotic de ultimă linie în medicina umană pentru terapia infecțiilor cu bacterii rezistente la carbapeneme, recomandându-se **a fi limitată utilizarea în domeniul veterinar**.
16. Tulpinile de *Escherichia coli* producătoare de ESBL și/sau AmpC izolate și caracterizate molecular au fost încadrate în filogrupurile patogene (B2, D) reprezentând un procent de 36,43% . De asemenea, de la suinele abatorizate au fost izolate și tulpini comensale (52,42%) ce au fost încadrate în filogrupurile A și B1, evidențiindu-se astfel **circulația concomitentă și posibilul risc de transmitere a elementelor plasmidice codificatoare de antibioretistență**.
17. Analizând rezultatele prin prisma conceptului „*One Health*”, o atenție deosebită trebuie acordată tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de ESBL și/sau AmpC încadrate în **filogrupurile B2 și D, acestea fiind în majoritate tulpini cu o patogenitate ridicată**, ce posedă mai mulți factori de virulență în comparație cu tulpinile comensale.
18. Rezultatele cercetărilor noastre evidențiază o **frecvență crescută a tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de ESBL în fermele de suine**, cu posibilul transfer atât de tulpini bacteriene antibioretistente cât și de elemente plasmidice între suine și personalul din ferme. Astfel, controlul emergenței și răspândirii antibioretistenței trebuie să reprezinte **o prioritate pentru toți actorii din sănătatea publică**, la nivel național și mondial.

BIBLIOGRAFIE

REFERENCES

1. Aarestrup FM, Hasman H, Agerso Y, Jensen LB, Harksen S, Svensmark B., 2006 - *First description of blaCTX-M-1-carrying E. coli isolates in Danish primary food production*. J. Antimicrob. Chemother. vol. 57 p. 1258 – 1259.
2. Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H., 2012 - *Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC) – producing E. coli in Danish slaughter pig and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporinus age*. J. Antimicrob. Chemother. vol. 67, p. 582 –588.
3. Allen HK, Donato J, Wang H, Cloud-Hansen KA, Davies J, et Handelsman J., 2010 - *Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments*. Nature reviews microbiology, vol. 8, p. 251–259.
4. Ambler R.P., 1980 - *The structure of β -lactamases*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. vol. 289, p. 321-331.
5. Andersen VD, Jensen VF, Vigre H, Andreasen M, Agersen Y., 2015 - *The use of third and fourth generation cephalosporins affects the occurrence of extended-spectrum cephalosporinase-producing Escherichia coli in Danish pig herds*. Vet J. Jun; vol. 204, no. 3, p. 345-350.
6. Argudín Maria Angeles et al. 2017 - *Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes*, Antibiotics, vol. 6, no. 2, p. 12., doi:10.3390/antibiotics6020012.
7. Aubert D., Poirel L., Chevalier J., Leotard S., Pages J. M., Nordmann P., 2001 - *Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother, vol. 45, p. 1615–1620.
8. Bali EB, Acik L., Sultan N., 2010 - *Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital*. African Journal of Microbiology Research, vol. 4, nr. 8, p. 650–654.
9. Ball P., 2000 – *Quinolone generations: natural history or natural selection*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 46, Suppl T1, p. 17-24.
10. Baquero F., Alvarez-Ortega C., Martinez J.L., 2009 – *Ecology and evolution of antibiotic resistance*. Environ Microbial Reports, vol. 1, p. 469-476.
11. Bauernfeind A., Chong Y. , Schweighart S., 1989 - *Extended Broad Spectrum Beta-Lactamase in Klebsiella pneumoniae Including Resistance to Cephamycins*. Infection. vol. 17, nr. 5. p316–321
12. Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S., 1990 - *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli*, Infection, vol. 18, p. 294–298.

13. Bayer M.E., Carlemalm E., Kellenger E., 1985 - *Capsule of E. coli k.29: ultra structural preservation and immuno electri in microscop*, z. J. bacteriology. Vol. 162, nr.3, p. 985-991.
14. Ben SL, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, Ben Slama K et Torres C., 2015 - *Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia*. International Journal of Food Microbiology, vol. 203, p. 86-92.
15. Bennett P.M., 2008 – *Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisitionand transfer of antibiotic resistance genes in bacteria*. Br J Pharmacol, vol. 153 Suppl. 1, p. 347-357.
16. Bergšpica I., Kaprou G., Alexa E.A., Prieto M., Alvarez-Ordóñez A., 2020 - *Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli in Pigs and Pork Meat in the European Union*. Antibiotics. vol. 9, nr. 10, p. 678
17. Bevan E.R., Jones A.M., and Hawkey P.M., 2017 - *Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype*. J Antimicrob Chemother, vol.72, nr.8, p. 2145-2155.
18. Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., Denamur E., 1998 - *Phylogenetic analysis of E. coli strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 groupstrains.*, J. Infect. Dis., vol. 177, p. 642–650.
19. Birkett C.I., Ludlam H.A., Woodford N., Brown D.F.J., Brown N.M., Roberts M.T.M., Milner N., Curran M.D., 2007 - *Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases*. J. Med. Microbiol. vol. 56, Pt. 1, p. 52-55.
20. Blair JM., Webber MA., Baylay AJ., Ogbolu DO., Piddock LJ., 2015 - *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nat Rev Microbiol, vol.13 no.1, p. 42-51.
21. Blanc V., Mesa R., Saco M., Lavilla S., Prats G., Miró E., Navarro F., Cortés P., Llagostera M., 2006 – *ESBL - and plasmidic class C beta-lactamase producing E. coli strains isolated from poultry, pig and rabbit farms*. Veterinary Microbiology. vol. 118, p. 299–304.
22. Blanco M., Blanco J.E., Mora A. and Blanco J., 1998 - *Distribution and characterization of faecal necrotogenic E. coli CNF1 and CNF2 isolated from healthy cows and calves*. Veterinary Microbiology vol. 59, p. 183–192.
23. Bonnet R., 2004 – *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 48, p. 1–14.
24. Börjesson S., Ny S, Egervärn M, et al. 2016 - *Limited Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase and Plasmid-Encoded AmpC-Producing Escherichia coli from Food and Farm Animals, Sweden*. Emerg Infect Dis. vol. 22, nr.4, p. 634-640.
25. Boyd E.F., Hartl D.L., 1998 - *Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of Escherichia coli have a phylogenetically clustered distribution*. J. Bacteriol. vol. 180 nr. 5, p. 1159-1165.

26. Bradford P.A., 2001 - *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat*. Clinical Microbiology Reviews. vol.14, p. 933–951.

27. Branger C., Zamfir O., Geoffroy S., et al., 2005 - *Genetic background of Escherichia coli and extended-spectrum beta-lactamase type*. Emerg Infect Dis. vol.11, nr.1, p. 54-61.

28. Brinas L., Moreno M. A., Teshager T., Saenz Y., Porrero M. C., Dominguez L., Torres C., 2005 - *Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains from healthy and sick animals in Spain in 2003*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 49, nr. 3, p. 1262-1264,

29. Brolund A., 2014 - *Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective*. Infect Ecol. Epidemiol. vol. 4, p. 10,

30. Buiuc D., Neagu M., 2009 – *Tratat de Microbiologie medicală*, Ed.III, Editura Medicală, București.

31. Burow M.D., Starr J.L., Park C.H., Simpson C.E., Paterson A.H., 2014 - *Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTLs) for resistance to the root-knot nematode [Meloidogyne arenaria (Neal) Chitwood] in an advanced backcross-QTL population of peanut (Arachis hypogaea L.)*. Molecular Breeding. vol. 34, nr. 2, p. 393-400.

32. Bush K., 1988 - *Beta-Lactamase inhibitors from laboratory to clinic*. Clin. Microbiol. Rev. vol. 1, p. 109–123.

33. Bush K., 1989 - *Characterization of beta beta-lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother, vol. 33, p. 259–263.

34. Bush K., 2018 - *Past and Present Perspectives on β -Lactamases*. Antimicrob Agents Chemother. vol. 62, nr.10, p. 1076-18.

35. Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., Jacoby G.A., Kishony R., Kreiswirth B.N., Kutter E., Lerner S.A., Levy S., Lewis K., Lomovskaya O., Miller J.H., Mobashery S., Piddock L.J., Projan S., Thomas C.M., Tomasz A., Tulkens P.M., Walsh T.R., Watson J.D., Witkowski J., Witte W., Wright G., Yeh P., Zgurskaya H.I., 2011 - *Tackling antibiotic resistance*. Nat Rev Microbiol. vol. 9, nr. 12, p. 894-896.

36. Bush K., Freudenberger J.S., Sykes R.B., 1982 - *Interaction of azthreonam and related monobactams with beta-lactamases from gram-negative bacteria*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 22, p. 414–420.

37. Bush K., Jacoby G.A., 2010 - *Updated Functional Classification of β -Lactamases*. Antimicrobial agents and chemotherapy. vol. 54, p. 969–976.

38. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A., 1995 - *A functional classification scheme for beta_lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob. Agents Chemother., vol. 39, p. 1211–1233.

39. Calbo E., Freixas N., Xercavins M., 2011 - *Food borne nosocomial out break of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control*. Clin. Infect. Dis., vol. 52, p. 743-749.

40. Calistri P., Iannetti S., Danzetta M.L., Narcisi V., Cito F., Sabatino D.D., Bruno R., Sauro F., Atzeni M., Carvelli A., Giovannini A., 2013 - *The components of 'One World – One Health' approach*. Transbound Emerg Dis vol. 60, Suppl. 2, p. 4-13.
41. Canton R., Akova M., Carmeli Y., 2012 - *Rapid evolution and spread of carbapenemases among enterobacteriaceae in Europe*. ClinMicrobiol Infect., vol.18, p. 413-431.
42. Carattoli A., 2008 - *Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers*. Clin. Microbiol. Infect. vol. 14, Suppl. 1, p. 117–123.
43. Carattoli A., 2013 - *Plasmids and the spread of resistance.*, Int J Med Microbiol vol. 303, p. 298–304.
44. Carattoli A., García-Fernández A., Varesi P., Fortini D., Gerardi S., Penni A., Mancini C., Giordano A., 2008 - *Molecular epidemiology of E. coli producing extended-spectrum beta- lactamases isolated in Rome, Italy.*, J Clin Microbiol. vol. 46, p. 103–108.
45. Carlet J., Collignon P., Goldmann P. ş.a., 2011 - *Society's failure to protect a precious resource: antibiotics*. Lancet. vol. 378, p. 369–371.
46. Carlo J., 2012 - *The gut is the epicentre of antibiotic resistance* Antimicrob Resist Infect Control. vol 1: 39.
47. Carmo L.P., Nielsen L.R., da Costa P.M., Alban L., 2014 - *Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing Escherichia coli in meat in Denmark*, Infect. Ecol. Epidemiol., vol. 4, p. 10
48. Caroff N., Espaze E., Gautreau D., Richet H., Reynaud A., 2000 - *Analysis of the Effects of -42 and -32 ampC Promoter Mutations in Clinical Isolates of Escherichia coli Hyperproducing AmpC*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. vol. 45, nr. 6. p783–788.
49. Cavaco LM., Abatih E., Aarestrup FM., Guardabassi L., 2008 - *Selection and persistence of CTX-M-producing E. coli in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or ceftiofur*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 52, p. 3612–3616
50. Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., 2004 - *Beta-lactam antibiotics*. EMC-Maladies Infectieuses. vol.1, p. 129–202.
51. Chantziaras I., Boyen F., Callens B., Dewulf J., 2014 - *Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries*. J Antimicrob Chemother vol.69, nr. 3, p. 827–834
52. Cherry L., 2011 - *Genotyping Escherichia coli Isolates from Duck, Goose, and Gull Fecal Samples with Phylogenetic Markers using Multiplex Polymerase Chain Reaction for Application in Microbial Source Tracking*. J. Exp. Microbiol. Immunol. vol.15, p. 130-135.
53. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., 2000 - *Rapid and Simple Determination of the E. coli Phylogenetic Group.*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, nr. 10, p. 4555-4558.
54. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009 - *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement*. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

55. Collignon P., Aarestrup F.M., Irwin R., McEwen S., 2013- *Human deaths and third generation cephalosporin use in poultry, Europe*. Emerging Infect Dis vol. 19 nr. 8, p. 1339–1340.
56. Collignon P.C., Conly J.M., Andreumont A., McEwen S.A, Aidara-Kane A. et al. World Health, 2016 - *Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production*. Clin Infect Dis. vol. 63, p. 1087–1093.
57. Conceição-Neto N., Theuns S., Cui T., et al., 2017 - *Identification of an enterovirus recombinant with a torovirus-like gene insertion during a diarrhea outbreak in fattening pigs*. Virus Evol. vol. 3, nr. 2.
58. Coque T.M., Oliver A., Perez-Diaz J.C., Baquero F., Canton R., 2002 - *Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000)*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 46, p. 500–510.
59. Cornick N.A., Vukhac, H., 2008 - *Indirect transmission of Escherichia coli O157:H7 occurs readily among swine but not among sheep*. Applied and environmental microbiology vol. 74, p. 2488-2491.
60. Cozma A.P., 2017 - *Determinarea riscului de portaj și a direcției de transmitere a enterobacteriaceelor producătoare de ESBL la animalele de companie și proprietarii acestora*, Teză de doctorat, USAMV Iași,
61. Cremet L., Bourigault C., Lepelletier D., 2012 – *Nosocomial out break of carbapenem-resistant Enterobacter cloacae highlighting the interspecies transferability of the bla_{OXA}-48 gene in the gut flora*. J Antimicrob Chemother. vol. 67, p. 1041-1043.
62. D’Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM., 2013 - *CTX-M type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance*. Int. J. Med. Microbiol. vol. 303, p. 305-317.
63. Da Costa P.M., Loureiro L., Matos A.J.F. 2013 - *Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment*. International journal of environmental research and public health, vol.10, p. 278-294.
64. Dandachi I., Chabou, S., Daoud, Z., Rolain, J.M., 2018 - *Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin*. Front. Microbiol., vol.9, p. 2299.
65. Davies J., Davies D., 2010 - *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol Mol Biol Rev. vol. 74, nr. 3, p. 417-433.
66. Denamur E., Picard B., Tenaillon O., 2010 - *Population genetics of pathogenic E. coli*, In Bacterial population genetics in infectious disease. p. 269–286. John Wiley&Sons, Inc, New York.
67. Depoorter P., Persoons D., Uyttendaele M., Butaye P., De Zutter L., Dierick K., et al., 2012 - *Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant E.*

coli (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. Int J Food Microbiol. vol. 159, p. 30–38.

68. Dierikx C.M., van Duijkeren E., Schoormans A.H.W., van Essen-Zandbergen A., Veldman K., Kant A., Huijsdens X.W., van der Zwaluw K., Wagenaar J.A., Mevius D.J., 2012 – *Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animal and horses*, J Antimicrob Chemother., vol. 67, nr. 6, p: 1368–1374.

69. Dohmen W, Bonten MJ, Bos ME, et al., 2015 - *Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs*. Clin Microbiol Infect. vol. 21, nr. 10, p. 917-923.

70. Dohmen W., Dorado-Garcia A., Bonten J.M.M., Wagenaar A. J. Wagenaar, Mevius D., Dick J., 2017 -*Risk factors for ESBL-producing E. coli on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials*. Plos One. vol.12, nr. 3.

71. Donnenberg M.S., 2002 - *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Academic Press. San Diego, California.

72. Dos Santos L.L., Pestana A.F., Barbato L., Melo L.C., Moura R., Lincopan N., 2013 - *Emergence of extended-spectrum β -lactamase (esbl)-producing Escherichia coli in domestic animals*. A. Méndez-Vilas. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Brazil. vol.3, p. 1600-1607.

73. Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventre A., Elion J., Picard B., Denamur E., 2001 - *Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations*. Microbiology. vol.147 p. 1671–1676.

E. coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. J. Bacteriol. vol. 190, p. 6881–6893.

74. Eftekhari F., Seyedpour S.M., 2015 - *Prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae from Imam Hussein Hospital in Tehran., Iran J Med Sci*, vol. 40, nr. 6, p. 515-521.

75. Egervärn M., Englund S., Ljunge M., Wiberg C., Finn M., Lindblad M., Börjeson S., 2017 - *An unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase-producing Escherichia coli in Swedish surface waters used for drinking water supply*, Science of The Total Environment, vol 587–588, p 466-472,

76. Elliott C., Justiz-Vaillant A., 2018 - *Nosocomial Infections: A 360-degree Review*, International Biological and Biomedical Journal. vol.4 nr. 2, p. 72-81.

77. EMA, 2016 - *European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health*. London (UK): EMA/CVMP/CHMP/231573/2016.

78. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012 - *Surveillance report - Surveillance of antimicrobial consumption in Europe*, ISBN 978-92-9193-589-5, doi 10.2900/32937.

79. European Centre for Disease Prevention and Control European Food Safety Authority European Medicines Agency, 2017 - *ECDC/EFSA/EMA second joint report on*

the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFSA Journal 2017 European Centre for Disease Prevention and Control: EARSS net data base. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4872>

80. Euzeby J.P. 2004 - *Dictionnaire de bacteriologie veterinaire*. <http://www.bacterio.cict.fr/>. Accesat, septembrie 2019.

81. Everest P., 2007 - *The Enterobacteria*, 2nd Edition. Gut. Vol. 56, nr. 9, p. 1331.

82. Evers E.G., Pielaat A., Smid J.H., van Duijkeren E., Vennemann F.B., Wijnands L.M., Chardo J.E., 2017 - *Comparative exposure assessment of ESBL-producing Escherichia coli through meat consumption*. PLOS ONE. vol. 12, nr.1.

83. Ewers C., Bethe A., Semmler T., Guenther S., Wieler L.H., 2012 - *Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing E. coli from live stock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective*, Clin Microbiol Infect, vol. 18, p. 646-655.

84. Ewers C., Grobbel M., A. Bethe, Wieler L.H., Guenther S., 2011 - *Extended-spectrum beta-lactamases-producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted*. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, vol. 124, p. 94-101.

85. Finlay B.B., Falkow S. 1997- *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. Microbiol Mol Biol Rev. vol. 61, nr. 2. p.136-69.

86. Founou L.L., Founou R.C., Essack S.Y., 2016 - *Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective*. Front Microbiol. vol. 7, p. 1881.

87. Friese A., Schulz J., Laube H., von Salviati C., Hartung J., Roesler U., 2013 - *Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing E. coli from animal farms in Germany*. Microbiol Mol Biol Rev. vol.126, nr.3-4, p. 175-180.

88. Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A., Takahashi Y., Torii K., Hasegawa T., Ohtal M., 2003 - *Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates*. Applied and Environmental Microbiology, vol.69, nr.9, p. 5336-5342.

89. Geser N., Stephan R., Hächler H., 2012 - *Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk*. BMC Vet. Res. vol. 8, p. 21.

90. Geser N., Stephan R., Kuhnert P., Zbinden R., Kaeppli U., Cernela N., Hächler H., 2011 - *Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in swine and cattle at slaughter in Switzerland*. J. Food Prot. vol. 74, p. 446-449.

91. Giraud-Morin C., Fosse T.A., 2003 - *Seven-year survey of Klebsiella pneumoniae producing TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase in Nice University Hospital (1994-2000)*. J. Hosp. Infect. Vol. 54, p. 25-31.

92. Giske C.G., Sundsfjord A.S., Kahlemeter G., Woodford N., Nordmann P., Paterson D.L., Canton R., Timothy R., 2009 - *Redefining extended-spectrum beta-lactams*:

balancing science and clinical need., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, nr. 1, p. 213-214.

93. Giuffre M., Geraci D.M., Bonura C., 2016 - *The Increasing Challenge of Multi-drug-Resistant Gram-Negative Bacilli: Results of a 5-Year Active Surveillance Program in a Neonatal Intensive Care Unit*. *Medicine (Baltimore)*. vol. 95, nr. 10, p. e3016.

94. Gordon D.M., Clermont O., Tolley H. & Denamur E., 2008 - *Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method*. *Environmental microbiology*. vol. 10, nr. 10, p. 2484-2496.

95. Grădinaru A., Solcan Ghe., Guguianu E., Chiriac S., 2016 - *Toxicologie și toxinfecții alimentare*. Editura „Ion Ionescu de la Brad” Iași.

96. Guet-Revillet H, Le Monnier A, Breton N, et al., 2012 - *Environmental contamination with extended-spectrum β -lactamases: is there any difference between Escherichia coli and Klebsiella spp.* *Am J Infect Control*. vol. 40, nr. 9, p. 845-848.

97. Guguianu E., 2002 - *Bacteriologie generală*, Editura Casa Venus, Iasi.

98. Gundran R.S., Cardenio P.A., Villanueva M.A. et al., 2019 - *Prevalence and distribution of bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing E. coli isolates from broiler farms in the Philippines*. *BMC Vet Res*. vol. 15, p. 227.

99. Gupta V., 2007 - *An update on newer β -lactamases*, *Indian J. Med. Res*. vol. 126, p. 417-427.

100. Gupta N., Limbago B.M., Patel J.B., Kallen A.J., 2011 - *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention*. *Clin. Infect. Dis*. vol. 53, p. 60-67.

101. Hachler H., Cohen S.P., Levy S.B., 1991 - *marA, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. vol. 173, p. 5532–5538.

102. Hammerum A.M., Larsen J., Andersen V.D., Lester C.H., Skovgaard Skytte T.S., Hansen F., et al. 2014 - *Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing E. coli obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins*. *J Antimicrob Chemother*. vol. 7, p. 1–8.

103. Hansen KH, Damborg P, Andreasen M, Nielsen SS, Guardabassi L., 2013 - *Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing Escherichia coli in pigs: a longitudinal study*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, nr.3, p. 794–798.

104. He F, Xu J., Wang J., Chen Q., Hua X., Fu Y., Yu Y., 2016 - *Decreased susceptibility to tigecycline mediated by a mutation in mlaA in Escherichia coli strains*. *Antimicrob Agents Chemother* vol. 60, p. 7530 –7531.

105. Herrero-Fresno A., Larsen I., Olsen J.E., 2015 - *Genetic relatedness of commensal Escherichia coli from nursery pigs in intensive pig production in Denmark and molecular characterization of genetically different strains*. *J Appl Microbiol*. vol. 119, p. 342–353.

106. Herzer P.J., Inouye S., Inouye M., Whittam T.S., 1990 - *Phylogenetic distribution of branched-RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of E. coli.*, *J. Bacteriol.*, vol. 172, p. 6175-6181.

107. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., 2008 - *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with health care-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007*. Infect Control Hosp. Epidemiol. vol. 29, p. 996–1011.
108. Hille K, et al. 2014 - *On the occurrence of Extended-spectrum- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in livestock: results of selected European studies*. Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift. vol. 127. p. 403–411
109. Horton R.A., Randall L.P., Snary E.L., Cockrem H., Lotz S., Wearing H., Duncan D., Rabie A., McLaren I., Watson E., La Ragione R.M, Coldham N.G., 2011 - *Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended spectrum beta-lactamase producing E. coli in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production*. Appl. Environ. Microbiol. vol.77, p. 3715–3719.
110. <http://eucast.org> (2018)
111. <https://www.efsa.europa.eu/en/interactive-pages/AMR-Report-2015> (2018)
112. Iredell J., Brown J., Tagg K., 2016 - *Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications*. BMJ. vol. 8, p. 352.
113. Jacoby A.G., 2009 – *AmpC β -lactamases*, Clinical Microbiology Reviews, vol. 22, nr. 1, p. 161-182.
114. Jacoby G., Cattoir V., Hooper D., Martínez-Martínez L., Nordmann P., Pascual A., Poirel L., Wang M., 2008 - *Qnr gene nomenclature*, Antimicrob. Agents Chemother. vol. 52, p. 2297–2299.
115. Jain A., Mondal R., 2008 - *TEM & SHV genes in extended spectrum β -lactamase producing Klebsiella species & their antimicrobial resistance pattern*. Indian J. Med. Res. vol. 128, p. 759–764.
116. Jimenez-Alcaide E, Medina-Polo J, Garcia-Gonzalez L, 2015 – *Health care-associated urinary tract infections in patients with a urinary catheter: Risk factors, microbiological characteristics and patterns of antibiotic resistance*. ArchEspUrol. vol. 68, p. 541-550.
117. Johnson J.R., Delavari P., Kuskowski M, Stell A.L., 2001 - *Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in Escherichia coli*. J Infect Dis. vol. 183, p. 78–88.
118. Johnson J.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A., Winokur, P.L., 2003 - *Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among Escherichia coli isolates from animals and humans*. The Journal of infectious diseases vol. 188, p. 759-768.
119. Johnson J.R., Stell A.L., 2000 - *Extended virulence genotypes of E. coli strains from patients with uro sepsis in relation to phylogeny and host compromise*, J. Infect. Dis., vol. 181, p. 261–272.
120. Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Johnson S.J., Logue C.M., White D.G., Doetkott C., Nolan L.K., 2007 – *Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic E. coli isolates*, Appl. Environ. Microbiol. vol. 73, p. 1976–1983.

121. Jorgensen R.L, Nielsen J.B, Friis-Moller A., Fjeldsoe-Nielsen H., Schonning K., 2010 – *Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of E. coli expressing an AmpC phenotype*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. vol. 65, nr. 3, p. 460–464.
122. Kao C.C., Liu M.F., Lin C.F., Huang Y.C., Liu P.Y., Chang C.W., Shi Z.Y., 2010 - *Antimicrobial Susceptibility and Multiplex PCR Screening of AmpC Genes From Isolates of Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, and Serratia marcescens.*, Journal of Microbiology Immunology and Infection, vol. 43, nr. 3, p. 180-187.
123. Kaper J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004 - *Pathogenic E. coli*. Nat. Rev. Microbiol. vol. 2, p. 123–140.
124. Kernodle D.S., Stratton C.W., McMurray L.W., Chipley J.R., McGraw P.A., 1989 - *Differentiation of β -lactamase variants of Staphylococcus aureus by substrate hydrolysis profiles*. J. Infect. Dis. vol. 159, nr. 1, p. 103-108.
125. Kittinger C., Lipp M., Folli B., Kirschner A., Baumert R., Galler H., Grisold A.J., Luxner J., Weissenbacher M., Farnleitner A.H., Zarfel G., 2016 - *Enterobacteriaceae Isolated from the River Danube: Antibiotic Resistances, with a Focus on the Presence of ESBL and Carbapenemases*. PLoS One. vol. 11(11):e0165820
126. Kola A., Kohler C., Pfeifer Y., Schwab F., Kühn K., Schulz K., Balau V., Breitbach K., Bast A., Witte W., Gastmeier P., Steinmetz I., 2012 - *High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany*. J Antimicrob Chemother. vol. 67, nr. 11, p. 2631–2634.
127. Kong KF, Schneper L., Mathee K., 2010 - *Beta-lactam antibiotics: from antibiotic to resistance and bacteriology*. Apmis. vol. 118, p. 1–36.
128. Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A. et Ben Moussa M., 2014 - *Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL)*. Medecine et maladies infectieuses. vol. 44, p. 400-404.
129. Lazarus B., Paterson D.L., Mollinger J.L., Rogers B.A., 2015 - *Do human extraintestinal Escherichia coli infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review*. Clin Infect Dis. vol. 60, nr. 3, p. 439-452.
130. Leistner R., Meyer E., Gastmeier P., Pfeifer Y., Eller C., 2013 - *Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive E. coli*. An exploratory case-control study., PLoSOne, vol. 8, nr. 9, p. e74323.
131. Leverstein-van Hall MA, Dierix CM, Cohen Stuart J, 2011 - *Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains*. Clin Microbial Infect., vl. 17, p. 873-880.
132. Levy S.B. and Marshall B., 2004- *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenge and responses*. Nat Med., vol. 10, nr.12, p. S122-9.
133. Levy S.B., 1982 - *Misuse threatens our precious antibiotics*. The Nation's Health, p. 5.

134. Levy S.B., 1982- *Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem*. Lancet. vol. 2 nr. 8289, p. 83-8.
135. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L., 2007 - *β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin*. Vet. Microbiol. vol. 121, p. 197–214.
- Licker M., Szekeli E., Flonta M., Djordjevic S.P., Timofte D., 2019 - *Genetic features of mcr-1 mediated colistin resistance in CMY - 2 producing E. coli from Romanian poultry*, Frontiers Microbiology. vol. 10, p. 2267.
136. Liebana E., Batchelor M., Hopkins K.L., Clifton-Hadley F.A., Teale C.J., Foster A., Barker L., Threlfall E.J., R. H. Davies. 2006 - *Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance*. J. Clin. Microbiol., vol. 44, p. 1630–1634.
137. Liebana E., Carattoli A., Coque T.M., Hasman H., Maqiorakos A.P., Mevius D., et al., 2013 - *Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options*. Clin. Infect. Dis. vol. 56, p. 1030–1037.
138. Liu X., Liu H., Wang L., Peng Q., Li Y., Zhou H., Li Q., 2018 - *Molecular Characterization of extended-spectrum beta-lactamases- producing multidrug resistant Escherichia coli from Swine in Northwest China*, Frontiers în Microbiology. vol. 11, p. 1756.
139. Liu Y.Y, Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J., 2016 - *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. Lancet Infect Dis. vol. 16, nr. 2, p. 161-168.
140. Livermore D. M., 1995 - *Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance*, Clinical Microbiology Reviews, vol. 8, nr. 4, p.557-584.
141. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L., Woodford, N., 2007 - *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. vol.59, nr.2, p165–174.
142. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L., Woodford N., 2007 - *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. J. Antimicrob. Chemother. vol. 59, p. 165–174.
143. Livermore D.M., Tulkens P.M., 2009 - *Temocillin revived*. J Antimicrob Chemother. vol. 63, nr. 2, p. 243–5.
144. Lowe C.F., McGeer A., Muller M.P., Katz K., for the Toronto, 2012 - *ESBL working group: Decreased susceptibility to non-carbapenem antimicrobials in extended-spectrum- β -lactamase-producing E. coli and Klebsiella pneumoniae isolates in Toronto, Canada*. Antimicrob Agents Chemother. vol. 56, p. 3977-3980.
145. Ludwig A., 1996 – *Cytolytic toxins from Gram negative bacteria*. Microbiologia. vol. 12, nr. 2, p. 281-296.

146. Luppi A., 2017 - *Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance*, Porcine Health Manag. vol. 3, p. 16.
147. 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 - *Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, vol. 18, nr. 3, p. 268-281.
148. Mansan-Almeida Rosane, Pereira Alex Leite, and Loreny Gimenes Giugliano, 2013 – *Diffusely adherent E. coli strains isolated from children and adults constitute two different populations*, BMC Microbiol. vol. 13, p. 22.
149. Matthew M., 1979 - *Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution*. J. Antimicrob. Chemother. vol.5, p. 349–358.
150. Măciucă I.E., 2014 - *"Prevalența tulpinilor de enterobacteriaceae producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) izolate din cecumul puilor de carne și implicațiile acestora asupra sănătății publice"*, Teză de doctorat, USAMV Iași,
151. Măciucă I.E., Cummins M.L., Cozma A.P., Rîmbu C., Guguianu E., Panzaru C.,
152. Măciucă I.E., Nicola J.W., Tuchilus C., Dorneanu O., Guguianu E., Carp-Cărare C., Rîmbu C., Timofte D., 2015 - *High prevalence of E. coli producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania*, Microbial Drug Resistance, vol. 21, nr. 6, p. 651-662.
153. Mărculescu A., Cernea M., Nueleanu Veturia, Oros N.A., Chereji R., 2007 – *Resistance to antibiotics*, Veterinarz Drug, vol.1, no.1.
154. Mesa R.J., Blanc V., Blanch A.R., Cortés P., González J.J., Lavilla S., Miró E., Muniesa M., Saco M., Tórtola M.T., Mirelis B., Coll P., Llagostera M., Prats G., Navarro F., 2006 - *Références bibliographiques extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage)*. The journal of antimicrobial chemotherapy. vol. 58, p. 211-215.
155. Meunier D., Jouy E., Lazizzera C., Kobisch M., Madec J.Y., 2006 - *CTXM-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical E. coli isolates recovered from food-producing animals in France*. Int. J. Antimicrob. Agents vol. 28, p. 402–407.
156. Miftode E., Dorneanu O., Badescu A., Ghibu L., Vremera T., Mereuță A., 2012 - *Emergence of a new group CTX-M enzyme in Romania and risk factors for extended spectrum beta-lactamase producing E. coli infections.*, Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi, vol. 116, nr. 2, p. 477-480.
157. Mihăescu Gr., Chifiriuc M.C., 2007 - *Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene*. Editura Academiei Române. București.
158. Miliță N.M., Romașcu L., Nicorici E., Nuțiu C.M., Lupescu C., Bărbuceanu F., 2017 - *Prevalența rezistenței la antimicrobiene a tulpinilor comensale de Escherichia coli sintetizatoare ESBL/AMPC, izolate din conținutul cecal al porcilor abatorizați în România*, Rev. Rom. Med. Vet. vol. 27 nr. 3, p. 9-12.

159. Milon A., Oswald E., Rycke D.J., 1999 - *Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic E. coli*. Vet. Res. vol. 30, p. 203-219.
160. Minarini LA, Poirel L, Trevisani NA, Darini AL, Nordmann P. 2009 - *Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil*. Diagn Microbiol Infect Dis vol 65(2), p.202-206
161. Miskinyte Migla, Isabel Gordo, 2013 – *Increased Survival of Antibiotic-Resistant E. coli inside Macrophages*, Antimicrob Agents Chemother. vol. 57, nr. 1, p. 189–195.
162. Moodley A., Guardabassi L., 2009 - *Transmission of IncN plasmids carrying bla_{CTX-M-1} between commensal E. coli in pigs and farm workers*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 53, p. 1709 –1711.
163. Morris A., Low D.E., 1999 - *Nosocomial bacterial meningitis, including central nervous systems infections*. Infect Dis Clin North Am. vol. 13, p. 735- 750.
164. Müller-Pebody B., Muscat M., Pelle B., Klein B.M., Brandt C.T., Monnet D.L. 2004 - *Increase and change in pattern of hospital antimicrobial use, Denmark, 1997-2001*. J Antimicrob Chemother. vol. 54, nr. 6, p. 1122-6.
165. Murphy D., Ricci A., Auce Z., Beechinor J.G., Bergendahl H., Breathnach R., et al. 2017 - *EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)*. EFSA J. 15:e04666. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4666
166. Nataro J.P., Kaper J.B., Browne R. Robins, Prado V., Vial P., and M. M. Levine. 1987 - *Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. Pediatr. Infect. Dis. J. vol. 6, p. 829–831.
167. Nikaido H., 2009 - *Multidrug resistance in bacteria*. Annu. Rev. Biochem. vol. 78, p. 119–146.
168. Nóbrega D.B., & Brocchi M., 2014 - *An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences*. The Journal of Infection in Developing Countries, vol. 8. Nr. 08, p. 954-960.
169. Norizuki C., Wachino J., Suzuki M., Kawamura K., Nagano N., Kimura K., Arakawa Y., 2017 - *Specific bla_{CTX-M-8}/IncII Plasmid Transfer among genetically diverse Escherichia coli isolates between humans and chickens*, Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.61, p. 6.
170. Ochoa J.T., Contreras C.A., 2011 - *Enteropathogenic E. coli (EPEC) infection in children*, Curr Opin Infect Dis. Oct. Vol. 24, nr. 5, p. 478–483.
171. Ojer-Usoz E., González D., Vitas A.I., et al., 2013 - *Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain*. Meat Sci. vol. 93, nr. 2, p. 316-321.
172. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M., 2016 - *Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance*. Int J Antimicrob Agents. vol. 47, nr.1, p. 1-3.
173. Olsson O., Bergström S., Lindberg F.P. , Normark S., 1983, - *AmpC Beta-Lactamase Hyperproduction in Escherichia coli: natural ampicillin resistance generated*

by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). Vol.80(24). p7556–7560

174. Organizația Mondială a Sănătății (OMS), 2014 - *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. Geneva; <http://www.who.int/drug-resistance/documents/surveillance-report/en/>

175. Oteo J., Delgado-Iribarren A., Vega D., et al. 2008 - *Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy*. Int J Antimicrob Agents; vol. 32, p. 534–537.

176. Overdevest I., Willemsen I., Rijnsburger M., et al. 2011 - *Extended-spectrum β -lactamase genes of Escherichia coli in chicken meat and humans*, The Netherlands. Emerg Infect Dis. vol. 17, nr. 7, p. 1216-1222.

177. Papanicolaou G.A., Medeiros A.A., Jacoby, G.A., 1990, *Novel Plasmid-Mediated Beta-Lactamase (MIR-1) Conferring Resistance to Oxyimino- and Alpha-methoxy Beta-Lactams in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. vol. 34, nr.11, p. 2200–2209.

178. Parmley E.J., Pintar K., Majowicz S., et al. 2013 - *A Canadian application of one health: integration of Salmonella data from various Canadian surveillance programs(2005-2010)*. Foodborne Pathog Dis. vol. 10, nr. 9, p. 747-756.

179. Partridge S.R., 2015 - *Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae*. Pathology. vol. 47, nr. 3, p. 276-84.

180. Pasqua M., Michelacci V., Di Martino M.L., Tozzoli R., Grossi M., Colonna B., Morabito S., and Prosseda G., 2017 - *The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive E. coli (EIEC) toward Pathogenicity*, Front Microbiol. vol. 8, p. 2390.

181. Paterson D.L., Hujer K.M., Hujer A.M., et al. 2003 - *Extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother. vol. 47, nr. 11, p. 3554-3560.

182. Paton J.H., Reeves S., 1988 - *Fluoroquinolone antibiotics: microbiology, pharmacokinetics and clinical use*. Drugs. vol.36, p. 193-228.

183. Peterson J., Garges S., Giovanni M., 2009 - *The NIH human microbiome project*. GenomeRes. vol. 19, p. 2317-2323.

184. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W., 2010, *Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens*. Int J Med Microbiol. Vol. 300, nr. (6), p. 371–9.

185. Philip T.R., 2012 - *Antibiotics: groups and properties EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016*. EFSA Journal. 2018. vol. 16, nr. 2, p. 5182.

186. Philippon A., 2013 - *Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE), Extended spectrum beta-lactamases*. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. vol. 28, p. 287–296.

187. Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E., 1999 - *The link between phylogeny and virulence in E. coli extraintestinal infection*, Infect. Immun. vol. 67, p. 546–553.

188. Pinheiro da Silva, F. et al. 2007 - *CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcRγ inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation*. Nature Med. 13, 1368–1374).

189. Pitout J.D., Church D.L., Gregson D.B., et al., 2007 - *Molecular epidemiology of CTX-M-producing Escherichia coli in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates*. Antimicrob Agents Chemother; 51: 1281–86.

190. Poeta P., Radhouani H., Pinto L., Martinho A., Rego V., Rodrigues R., et al., 2009 - *Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli of different phylogenetic groups*. Journal of basic microbiology. vol. 49, p. 584–588.

191. Poole K., 2004 - *Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria*. Clin Microbiol Infect. vol. 10, nr. 1, p. 12-26.

192. Potron A., Poirel L., Croize J., Chantepredrix V., and Nordmann P., 2009 - *Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β-lactamase, RTG-4, from Acinetobacter baumannii*. Antimicrob, Agents Chemother. vol. 53, p. 3010–3016.

193. Qadri F., Svennerholm A.M., Faruque A.S.G., Bradley Sack R., 2005 – *Enterotoxigenic E. coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention*, Clin Microbiol Rev. vol. 18, nr. 3, p. 465–483.

194. Queenan A.M., Bush K., 2007 - *Carbapenemases: the versatile beta-lactamases*. Clin Microbiol Rev, vol. 20, nr. 3, p. 440-458.

195. Queenan A.M., Folen B., Gownley C., Wira E., and Bush K., 2004 - *Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing E. coli and Klebsiella pneumonia clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology*. J. Clin. Microbiol. vol. 42, p. 269–275.

196. Ramadan, A.A., Abdelaziz, N.A., Amin, M.A. et al. 2019, *Novel bla_{CTX-M} variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli*. Sci Rep vol. 9, p. 4224

197. Ramos S., Silva N., Dias D., Sousa M., Capelo-Martinez J.L., Brito F., Canica M., Igrejas G., Poeta P., 2013 - *Clonal diversity of ESBL - producing Escherichia coli in pigs at slaughter level in Portugal*. Foodborne Pathog. Dis. vol. 10, p. 74-79.

198. Randall L.P., Lemma F., Rogers J.P., Cheney T.E.A., Powell L.F., Teale C.J., 2014 - *Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli from pigs at slaughter in the UK in 2013*. J. Antimicrob. Chemother. vol. 69, p. 2947-2950.

199. Rasko D.A., Rosovitz M.J., Myers G.S., ș.a., 2008 - *The pangenome structure of*

200. Răpunțean Ghe., Răpunțean S., 2005 – *Bacteriologie specială veterinară*, Ed. Academic Pres, Cluj-Napoca, p. 38-46.

201. Răpunțean S., Răpunțean Ghe., 2017 – *Bacteriologie medicală veterinară și zoonoze bacteriene*, Ed. Academic Pres, Cluj Napoca.

202. Răpuncean S., Răpuncean Ghe., Boldizsar E., 1998 – *Sensibilitatea unor tulpini de Prototheca spp., la unele substanțe antifungice și chimioterapice* – Simp. Actual. Patol. Anim. Dom., Cluj-Napoca, vol. 2, nr. 2, 525-528.
203. Robicsek A., Strahilevitz J., Sahm D.F., Jacoby G.A., Hooper D.C., 2006 - *Qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 50, nr. 8, p. 2872-2874.
204. Robin F., Delmas J., Chanal C., Sirot D., Sirot J., and Bonnet R., 2005 – *TEM - 109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 beta-lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5).* Antimicrob Agents Chemother. vol. 49, p. 4443–4447.
205. Rodriguez-Villalobos H. et Struelens M.J., 2006 - *Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur.* Réanimation. vol. 15, p. 205-213.
206. Romașcu L.M., Miliță N.M., Bărbuceanu F., 2018 - *Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli isolated from slaughtered broilers in Romania*, DOI: 10.26416/Inf.55.3.2018.2037.
207. Roy C., Foz A., Segura C., Tirado M., Fuster C., and Reig R.. 1983 - *Plasmid determined beta-lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae.* J. Antimicrob. Chemother. vol. 12, p. 507–510.
208. Rugieri M.R., Hanno P.M., Levin R.M., 1985- *Mannose inhibition of Escherichia coli adherence to urinary bladder epithelium: comparison with yeast agglutination.* Urological Research. vol. 13, p. 79–84.
209. Rzewuska M., Czopowicz M., Kizerwetter-Uwida M., Chrobak D., Baszczak B., Binek M., 2015 - *Multidrug Resistance in E. coli Strains Isolated from Infections in Dogs and Cats in Poland (2007–2013)*, The Scientific World Journal, vol. 2015, p.1-8.
210. Savageau M.A., 1983 - *E. coli habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control.* Am. Nat. vol. 122, p. 732–744.
211. Scheutz F., Strocckbine N., 2005 - *The Gamma-proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Genus I. E. vol. 2, p. 607-624,
212. Schjorring S., Krogfelt K.A., 2011 - *Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut.* Int. J. Microbiol., vol. 2011, p. 312956.
213. Schmithausen R.M., Schulze-Geisthoevel S.V., Stemmer F., et al. 2015 - *Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel.* PLoS One. vol. 10, nr. 9, p. e0138173.
214. Schulze-Geisthövel S., Schmithausen R., Stemmer F., El-Sade M., Hoerauf A., Exner M., Bierbaum G., Bekeredjian-Ding I., Petersen B., 2014 - *Occurrence of MRSA and ESBL in different habitats and different stages of the pork production chain. In Proceedings of the DACH Epidemiologi etagung "Tiergesundheit und Ökonomie", Zürich, Schweiz.*
215. SDa (The Netherlands Veterinary Medicines Authority), 2013- *Usage of antibiotics in livestock in The Netherlands in 2012*, www.autoriteitdiergeneesmiddelen.nl/en/publications/general-reports

216. Segatore B., Massidda O., Satta G., Setacci D., and Amicosante G., 1993 - *High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from Aeromonas hydrophila AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 37, p. 1324–1328.
217. Selander R.K., Caugant D.A., Whittam T.S., 1987 - *Genetic structure and variation in natural populations of E. coli* in Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger H.E., editors . *E. coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 1625-1648.
218. Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi S. M. D. & Kamal M. A., 2015- *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment*. Saudi J. Biol. Sci. vol. 22, p. 90–101.
219. Sharp H., Valentin L., Fischer J., Guerra B., Appel B., Käsbohrer A., 2014 - *Ab-schätzung des Transfers von ESBL-bildenden Escherichia coli zum Menschen für Deutschland [Estimation of the transfer of ESBL-producing Escherichia coli to humans in Germany]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. vol. 127, nr. 11-12, p. 464-477.
220. Sirot D., Recule C., Chaibi E. B., Bret L., Croize J., Chanal-Claris C., Labia R., and Sirot J.. 1997 - *A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an E. coli clinical isolate*. Antimicrob. Agents Chemother. vol. 41. p. 1322–1325.
221. Skurnik D. et Andremont A., 2006 - *Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique*. Réanimation. vol. 15, p. 198–204.
222. Smet A., Martel A., Persoons D., Dewulf J., Heyndrickx M., Herman L., Hasebrouck F. , Butaye P., 2010 – *Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health*. FEMS Microbiol. Rev. vol. 34, p. 295–316.
223. Smith H.R., Cheasty T, Rowe B., 1997 - *Enteraggregative Escherichia coli and outbreaks of gastroenteritis in UK*. Lancet. vol. 350, nr. 9080, p. 814-815.
224. Song J., Sung-Suck O., Junghee K., Park S., Shin J., 2020- *Clinically relevant extended-spectrum beta-lactamases-producing Escherichia coli isolates from food animals in South Korea*, Frontiers in Microbiology. vol. 11, p. 604.
225. Stecher B., Denzler R., Maier L., 2012 - *Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae*. Proc Natl Acad Sci USA., vol. 109, p. 1269-1274.
226. Stedt J., Bonnedahl J., Hernandez J., Waldenstrom J., McMahon B.J., Tolf C., Olsen B., Drobni M., 2015- *Carriage of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in gulls across Europe*. Acta Vet.Scand. vol. 57, p.74.
227. Stefani S., Giovanelli I., Anacarso I., et al. 2014 - *Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Northern Italy*. New Microbiol. vol. 37, nr. 4, p. 551-555.
228. Sternbach G., and Varon J., 1992 - *Alexander Fleming: the spectrum of penicillin*. J. Emerg. Med. vol. 10, p. 89–91.

229. Swartz M.N., 2000 - *Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998*. Antimicrob Agents Chemother. vol. 44, nr. 8, p. 2009-2016.
230. Tamang M.D., Nam H.M., Kim S.R., Chae M.H., Jang G.C., Jung S.C., Lim S.K., 2013-*Prevalence and molecular characterization of CTX-M beta-lactamase- producing Escherichia coli isolated from healthy swine and cattle*. Food-borne Pathog. Dis. vol. 10, p. 13-20
231. Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E., 2010- *The population genetics of commensal E. coli*. Nat Rev Microbiol., vol. 8, p. 207-217.
232. Thomas C.M., Nielsen K.M., 2005- *Mechanisms of and barriersto, horizontal gene transfer between bacteria*. Nat RevMicrobiol. vol. 3, nr. 9, p. 711-721.
233. Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C., Karoui M.E., Frapy E., Garry L., Ghigo J.M., Gilles A.M., Johnson J., Le Bouguénec C., Lescat M., Mangenot S., Martinez-Jéhanne V., Matic I., Nassif X., Oztas S., Petit M.A., Pichon C., Rouy Z., Ruf C.S., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Médigue C., Rocha E..P, Denamur E., 2009 - *Organised genome dynamics in the E. coli species results in highly diverse adaptive paths*. PLoS Genet. vol. 5, p. e1000344.
234. Trotz-Williams L.A., Mercer N.J., Walters J.M., Maki A.M., Johnson R.P., 2012 - *Pork implicated in a Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 outbreak in Ontario, Canada*. Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique vol. 103, p. e322-326.
235. Van Damme I., Garcia-Graells C., Biasino W., Gowda T., Botteldoorn N., De Zutter L., 2017- *High abundance and diversity of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in faeces and tonsils of pigs at slaughter*. Vet. Microbiol., vol. 208, p. 190-194.
236. Van Duin D., Paterson D.L., 2016 - *Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned*. Infect Dis Clin North Am. vol. 30, nr. 2, p. 377-390.
237. Von Salviati C., Friese A, Roschanski N, et al. 2014 - *Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing Escherichia coli in German fattening pig farms: a longitudinal study*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. vol. 127, nr. 9-10, p. 412-419.
238. Walther-Rasmussen J., and Hoiby N., 2004 - *Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases*. Can. J. Microbiol. vol. 50, p. 137-165.
239. Walther-Rasmussen J., and Hoiby N., 2006 - *OXA-type carbapenemases*. J.Antimicrob. Chemother. vol. 57, p. 373-383.
240. Wanke C.A., Gerrior J., Blais V., 1998 - *Successful treatment of diarrheal disease associated with enteroaggregative E. coli in adults infected with human immunodeficiency virus*. J Infect Dis. vol. 178, p. 1369.
241. Wedley A.L., Maddox T.W., Westgarth C., Coyne K.P., Pinchbeck G.L., Williams N.J., Dawson S., 2011 - *Prevalence of antimicrobial-resistant Escherichia coli in*

dogs in a cross-sectional, community-based study. Veterinary Record. vol. 168 nr. 13, p. 354.

242. Wellington E.M., Boxall A.B., Cross, P., Feil E.J., Gaze W.H., Hawkey P.M., Johnson Rollings, A.S., Jones D.L., Lee N.M., Otten W., and Thomas C.M., 2013- *The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria.* The Lancet Infectious Diseases vol. 13, p. 155–165.

243. Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C. 2007- *Methicillin resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, central Europe.* Emerg. Infect. Dis. vol. 13, p. 255–258.

244. Woerther P.L., Burdet C., Chachaty E., Andremonet A., 2013 - *Trends in human fecal carriage of extended-spectrum b-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M.* Clin Microbiol Rev vol. 26, p. 744–758.

245. Woodford N., Reddy S., Fagan E.J., Hill R.L., Hopkins K.L., Kaufmann M.E., Kistler J., Palepou M.F., Pike R., Ward M.E., Cheesbrough, J., Livermore D.M., 2007. *Wide Geographic Spread of Diverse Acquired AmpC Beta-lactamases Among Escherichia coli and Klebsiella spp. in the UK and Ireland.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. vol. 59(1). p 102–105.

246. Woodward L.D., Clifford G.C., Richard A.C. , Rafiq A. , Frank G.R., 2002 - *Verotoxigenic E. coli (VTEC): A major public health threat in Canada.* Can J Infect Dis. Sep-Oct. vol. 13, nt. 5, p. 321–330.

247. World Bank, 2017 – *Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future.* Washington, DC: World Bank.

248. Xavier B.B., Lammens C., Ruhel R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S., 2016 - *Identification of a novel plasmid-mediated colistin- resistance gene, mcr-2, in E. coli, Belgium.* Euro Surveill. vol. 21, nr. 27.

249. Zheng H., Zeng Z., Chen S., Liu Y., Yao Q., Deng Y., Chen X., Lv L., Zhuo C., Chen Z., Liu J.H., 2012- *Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst Escherichia coli isolates from healthy food animals in China.* Int. J. Antimicrob. Agents vol. 39, p. 305–310

ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR ANNEX 1. ABBREVIATIONS LIST

ESBL	enzime sintetizatoare de beta-lactamaze
EFSA	Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogene
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigene
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvazive
EHEC/NTEC	<i>E. coli</i> enterohemoragice sau necrotoxigene
VTEC/STEC	<i>E. coli</i> verotoxigene
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregative
DAEC	<i>E. coli</i> difuz aderente
<i>RMA</i>	rezistență multiplă la antibiotice
STEC	<i>E. coli</i> producătoare de toxină Shiga
PLP	site-uri de legare a penicilinei
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
PC1	peniciline
CMI	concentrație minimă inhibitorie
MDB	metoda microdiluției în bulion
CTX	cefotaxime
MC	MacConkey
AM	antimicrobiene
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
LSVSA	Laboratorul Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor
DSVSA	Direcția Sanitar veterinară și pentru Siguranța Alimentelor
EURL-AR	Laboratorului de Referință al Uniunii Europene pentru Rezistența Antimicrobiană
APT	apă peptonată tamponată
MC	MacConkey
CTX	cefotaxime
TSI	tri-sugar-iron agar
MIU	mobilitate-indol-uree
ONPG	O-nitrophenyl-b -D-galacto-pyranoside
CMI	concentrației minime inhibitorii
CAMHB	bulion Muller-Hinton ajustat cationic cu tampon TES
UE	Uniunea Europeană
AMP	ampicilină
TEM	timociclin

CTX	cefotaxim
CAZ	ceftazidim
GEN	gentamicină
SMX	sulfametoxazol
TMP	trimetoprim
CIP	ciprofloxacina
NAL	acid nalidixic
CHL	cloramfenicol
AZI	azitromicină
TGC	tigeciclină
COL	colistină
MERO	meropenem
FOX	cefoxitin
FEP	cefepime
CTX	cefotaxim
TAZ	ceftazidim
TEM	temocilin
IMI	imipenem
MERO	meropenem
ETP	ertapenem
EUCAST	Comitetul European pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene
RAM	Rezistența antimicrobiană
MC+CTX	MacConkey suplimentat cu cefotaxim

ANEXA 2. LISTA TABELELOR

Tabel		Pagina
Tabelul 2.1	Scheme de clasificare pentru beta-lactamazele bacteriene (Bush ș.a., 1995)	37
Tabelul 6.1	Proveniența și numărul de probe recoltate	55
Tabelul 6.2	Set de substanțe antimicrobiene care trebuie incluse în monitorizarea RAM, pragurile EUCAST care indică rezistență și intervalele de concentrație testate în cazul <i>Salmonella spp.</i> și <i>E. coli</i> indicator comensal (primul set)	62
Tabelul 6.3	Set de substanțe antimicrobiene, valorile-limită epidemiologice EUCAST (ECOFF) și valorile care indică rezistență clinică, precum și intervalele de concentrație care trebuie utilizate doar pentru testarea izolatelor de <i>Salmonella spp.</i> și <i>E. coli</i> indicator comensal rezistente la cefotaximă sau ceftazidimă sau meropenem – (al doilea set)	63
Tabelul 6.4	Centralizarea rezultate obținute în urma detecției ESBL/AmpC la abatoarele din Iași, Botoșani și Suceava în perioada 2016-2018	66
Tabelul 6.5	Fenotipurile confirmate la izolatele de <i>E. coli</i> cultivate pe mediul MC+CTX*	67
Tabelul 6.6	Sinteza rezultatelor referitoare la numărul de tulpini ce au fost considerate rezistente/sensibile la diverse categorii antimicrobiene beta-lactamice/non-beta-lactamice	69
Tabelul 7.1	Primerii utilizați pentru identificarea celor mai importante gene ce codifică enzimele CTX-M, TEM, SHV, OXA	76
Tabelul 7.2	Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins	77
Tabelul 7.3	Parametrii de amplificarea prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze PCR	79
Tabelul 7.4	Primerii utilizați pentru identificarea celor mai importante gene ce codifică rezistența mediată plasmidic la Fluoroquinolone și Colistin	80
Tabelul 7.5	Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze PCR	81
Tabelul 7.6	Parametrii de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ChuA, YjaA și a fragmentului de ADN TspE4.C2	82
Tabelul 7.7	Lungimea ampliconilor(bp) obținuți în urma testului PCR	83
Tabelul 7.8	Principalele gene identificate la izolatele de <i>E. coli</i> ESBL	83
Tabelul 7.9	Prevalența și combinația genelor identificate în izolatele de	88

	<i>E. coli</i> de origine umană și animală	
Tabelul 7.10	Sinteza rezultatelor privind caracterizarea substratului molecular al izolatelor de <i>E. coli</i> CTX-M pozitive	88
Tabelul 7.11	Rezultatele obținute la testarea PCR pentru tulpinile ESBL/AmpC incluse în studiu	94
Tabelul 7.12	Filogrupurile identificate la izolatele de <i>E. coli</i>	100
Tabelul 8.1	Rezultatele secvențierii produșilor PCR obținuți în urma amplificării pentru genele ce codifică enzimele CTX-MU, CTX-M1, CTX-M9	106

ANNEX 2. LIST OF TABLES

Table		Page
Table 2.1	Schemes for bacterial beta-lactamases (Bush ş.a., 1995)	37
Table 6.1	Origin and number of samples collected	55
Table 6.2	Set of antimicrobial substances to be included in RAM monitoring, EUCAST thresholds indicating resistance and concentration ranges tested for <i>Salmonella</i> spp. and <i>E. coli</i> commensal indicator (first set)	62
Table 6.3	Set of antimicrobial substances, EUCAST epidemiological limit values (ECOFF) and clinical resistance values, as well as the concentration ranges to be used only for testing <i>Salmonella</i> spp. şi <i>E. coli</i> isolates commensal indicator sheets resistant to cefotaxime or ceftazidime or meropenem - (second set)	63
Table 6.4	Centralization of ESBL / AmpC screening results at slaughterhouses in Iasi, Botoşani and Suceava during 2016-2018	66
Table 6.5	Phenotypes confirmed in <i>E. coli</i> isolates cultivated on MC + CTX* medium	67
Table 6.6	Summary of the results regarding the number of strains that were considered resistant / sensitive to various antimicrobial categories beta-lactam/non-beta-lactam	69
Table 7.1	Primers used to identify the most important genes encoding the enzymes CTX-M, TEM, SHV, OXA	76
Table 7.2	PCR amplification conditions for the identification of genes encoding extended-spectrum beta-lactamase enzymes	77
Table 7.3	Amplification conditions for identification of genes encoding AmpC beta-lactamase enzymes	79
Table 7.4	Primers used to identify the most important genes encoding plasmid-mediated resistance to Fluoroquinolone and Colistin	80
Table 7.5	Amplification conditions for identification of genes encoding AmpC beta-lactamase enzymes	81
Table 7.6	PCR amplification parameters for gene identification ChuA, YjaA and the TspE4.C2 DNA fragment	82
Table 7.7	The length of the amplicons (bp) obtained after the PCR test	83
Table 7.8	The main genes identified in <i>E. coli</i> ESBL isolates	83
Table 7.9	The prevalence and combination of genes are identified in <i>E. coli</i> isolates of human and animal origin	88
Table 7.10	Synthesis of the results regarding the characterization of the molecular substrate of <i>E. coli</i> isolates CTX-M positive	88

Table 7.11	Results obtained in PCR testing for ESBL / AmpC strains included in the study	94
Table 7.12	Phylogroups identify <i>E. coli</i> isolates	100
Table 8.1	Sequencing results of PCR products obtained from amplification for genes encoding the enzymes CTX-MU, CTX-M1, CTX-M9	106

ANEXA 3. LISTA FIGURILOR

Figura		Pagina
Fig. 2.1	Clasificarea moleculară a beta-lactamazelor dup clasificarea Ambler	36
Fig. 2.2	Conjugarea bacteriană.	42
Fig. 6.1	Identificarea zonelor de recoltare a probelor	55
Fig. 6.2	Deschiderea aseptică a cecumului (<i>original</i>)	56
Fig. 6.3	Recoltarea de conținut cecal (<i>original</i>)	56
Fig. 6.4	Cântărirea conținutului cecal (<i>original</i>)	57
Fig. 6.5	Adăugare apă peptonată (<i>original</i>)	57
Fig. 6.6	Colonii de <i>E. coli</i> prezumtiv sintetizatoare de ESBL pe agar MacConkey (MC) (Oxoid, Basingstoke, Marea Britanie) suplimentat cu cefotaxim (CTX) (Sigma-Aldrich) și confirmarea prin testele MIU/TSI (Oxoid, Basingstoke, UK) a izolatelor de <i>E. coli</i> (<i>original</i>).	57
Fig. 6.7.	Reprezentarea schematică a protocolului de lucru utilizat pentru detecția ESBL și încadrarea taxonomică a izolatelor obținute (EURL-AR)	58
Fig. 6.8	Placa EUVSEC, panel 1 de antibiotice (<i>original</i>)	59
Fig. 6.9.	Placa EUVSEC, panel 2 de antibiotice (<i>original</i>)	60
Fig. 6.10	Inoculator automat, plăcile EUVSEC inoculate și aparatul Biomic utilizat pentru citirea MIC	61
Fig. 6.11	Total tulpini prezumtiv producătoare de ESBL	65
Fig. 6.12	Total tulpini de origine animală prezumtiv producătoare de ESBL	65
Fig. 6.13	Total tulpini de origine umană prezumtiv producătoare de ESBL	66
Fig. 6.14	Fenotipuri confirmate la izolatele de <i>E. coli</i> de origine animală izolate pe mediul MC+CTX	67
Fig. 6.15	Fenotipuri confirmate la izolatele de <i>E. coli</i> de origine umană izolate pe mediul MC+CTX	68
Fig. 6.16	Rezistența antimicrobiană a izolatelor de origine animală în Europa și România pe 2015	72
Fig. 6.17	Caracterizarea rezistenței/sensibilității la antibiotice a izolatelor de origine animală	72
Fig. 6.18	Caracterizarea rezistenței/sensibilității la antibiotice a izolatelor de origine umană	73
Fig. 7.1	Extracția ADN-ului bacterian prin metoda „boiledpreps” (<i>original</i>)	74

Fig. 7.2	Kit MyTaq TM HSSRedMix (Bioline (<i>original</i>))	75
Fig. 7.3	Etapa de cuplare și amplificare în Icyclor(<i>original</i>)	76
Fig. 7.4	Încărcarea produșilor PCR în gelul de agarozăși analiza în GelDoc (<i>original</i>)	78
Fig. 7.5	Încadrarea în filogrupuri a unei tulpini de <i>E. coli</i> prin utilizarea genelor chuA și yjaA și a fragmentului de ADN TSPE4.C2. prin amplificare PCR (conform Clermont, 2000)	82
Fig. 7.6	Principalele gene identificate la tulpinile de <i>E. coli</i> izolate de la porcii abatorizați	84
Fig. 7.7	Rezultatele testului PCR pentru gena bla _{CTX-M-U}	84
Fig. 7.8	Rezultatele testului PCR pentru gena bla _{CTX-M1} și bla _{CTX-M-9}	85
Fig. 7.9	Procentajul grupurilor de enzime CTX-M identificate la tulpinile de origine animală	85
Fig. 7.10	Rezultatele testării prin PCR multiplex utilizând primerii TEM, SHV și OXA	86
Fig. 7.11	Principalele gene identificate la tulpinile de <i>E. coli</i> pentru izolatele umane	87
Fig. 7.12	Principalele genotipuri CTX-M identificate la izolatele de origine umană	87
Fig. 7.13	Prevalența izolatelor de origine animală CIT-M	90
Fig. 7.14	Prevalența izolatelor de origine umană CIT-M	90
Fig. 7.15	Procentajul izolatelor de origine animală purtătoare de gene ce codifică rezistența mediată plasmidică la Fluoroquinolone	91
Fig. 7.16	Prevalența tulpinilor de origine animală purtătoare de gene ce codifică rezistența mediată plasmidică la Colistin	92
Fig. 7.17	Rezultatele testării prin PCR pentru genele ChuA, YjaA, TspE4.C2	100
Fig. 7.18	Distribuția grupurilor filogenetice între tulpinile de <i>E. coli</i> producătoare beta-lactamaze izolate de la suine	101
Fig. 7.19	Distribuția grupurilor filogenetice între tulpinile de <i>E. coli</i> producătoare beta-lactamaze din izolatele umane	102
Fig. 7.20	Distribuția filogrupurilor identificate la izolatele de origine animală în funcție de fenotip	102
Fig. 7.21	Distribuția filogrupurilor identificate la izolatele de origine umană în funcție de fenotip	103
Fig. 8.1	Rezultatele obținute la secvențierea selectivă a izolatelor de origine animală și umană	107

ANNEX 3. LIST OF FIGURES

Figure		Page
Fig. 2.1	Molecular classification of beta-lactamases according Ambler classification	36
Fig. 2.2	Illustration of bacterial conjugation	42
Fig. 6.1	Identification of the sample collection areas	55
Fig. 6.2	Aseptic opening of the blind (<i>original</i>)	56
Fig. 6.3	Harvesting of cecal content (<i>original</i>)	56
Fig. 6.4	Weighing of the cecal content (<i>original</i>)	57
Fig. 6.5	Adding peptoned water (<i>original</i>)	57
Fig. 6.6	<i>E. coli</i> colonies presumably producing ESBL on MacConkey (MC) agar supplemented with cefotaxim (CTX) and confirmation by MIU/TSI tests of <i>E. coli</i> isolates (<i>original</i>)	57
Fig. 6.7.	Schematic representation of the working protocol used for ESBL screening and taxonomic classification of the isolates obtained (EURL-AR)	58
Fig. 6.8	EUVSEC plaque, panel 1 of antibiotics (<i>original</i>)	59
Fig. 6.9.	EUVSEC plaque, panel 2 of antibiotics (<i>original</i>)	60
Fig. 6.10.	Automatic inoculator, inoculated EUVSEC plates and Biomic device used for MIC reading	61
Fig. 6.11	Total presumptive strains producing ESBL	65
Fig. 6.12	Total strains of animal origin presumably producing ESBL	65
Fig. 6.13	Total strains of presumed human origin producing ESBL	66
Fig. 6.14	Phenotypes confirmed in <i>E. coli</i> isolates of animal origin isolated on MC + CTX medium	67
Fig. 6.15	Phenotypes confirmed in <i>E. coli</i> isolates of human origin isolated on MC + CTX medium	68
Fig. 6.16	Antimicrobial resistance of animal isolates in Europe and Romania in 2015	72
Fig. 6.17	Characterization of antibiotic resistance / sensitivity of animal isolates	72
Fig. 6.18	Characterization of antibiotic resistance / sensitivity of isolates of human origin	73
Fig. 7.1	Extraction of bacterial DNA by the “boiled preps” method (<i>original</i>)	74
Fig. 7.2	Kit MyTaq™ HS Red Mix (Bioline) (<i>original</i>)	75
Fig. 7.3	Coupling and amplification stage in Icyler (<i>original</i>)	76
Fig. 7.4	Loading PCR products into agarose gel and GelDoc analysis (<i>original</i>)	78

Fig. 7.5	Classification of an <i>E. coli</i> strain by phylogroups using the chuA and yjaA genes and the TSPE4.C2 DNA fragment. By PCR amplification (according to Clermont, 2000)	82
Fig. 7.6	The main genes identified in <i>E. coli</i> strains isolated from slaughtered pigs	84
Fig. 7.7	PCR test results for bla _{CTX-M-U} gene	84
Fig. 7.8	PCR test results for bla _{CTX-M1} și bla _{CTX-M-9} gene	85
Fig. 7.9	Percentage of groups of CTX-M enzymes identified in strains of animal origin	85
Fig. 7.10	Results of multiplex PCR testing using TEM, SHV et OXA	86
Fig. 7.11	The main genes identified in <i>E. coli</i> strains for human isolates	87
Fig. 7.12	The main CTX-M genotypes identified in isolates of human origin	87
Fig. 7.13	Prevalence of CIT-M animal isolates	90
Fig. 7.14	Prevalence of CIT-M human isolates	90
Fig. 7.15	Isolated percentage of animal origin carrying genes encoding plasmid mediated resistance to Fluoroquinolone	91
Fig. 7.16	Prevalence of strains of animal origin carrying genes encoding plasmid-mediated resistance to Colistin	92
Fig. 7.17	PCR test results for ChuA, YjaA, TspE4.C2 genes	100
Fig. 7.18	Distribution of phylogenetic groups among <i>E. coli</i> strains producing beta-lactamases isolated from pigs	101
Fig. 7.19	Distribution of phylogenetic groups among <i>E. coli</i> strains producing beta-lactamases from human isolates	102
Fig. 7.20	Distribution of identified phylogroups to animal isolates by phenotype	102
Fig. 7.21	Distribution of identified phylogroups to isolates of human origin by phenotype	103
Fig. 8.1	The results obtained from the solitary sequencing of isolates of animal and human origin	107

ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4. LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS

PRIM AUTOR:

1. **Marinela TIPIȘCĂ, Elena IȘAN**, 2015- The incidence of *Campylobacter* on bird caeca, *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol.58, nr.2, pg. 407-411.
2. **Marinela Tipișcă**, Andreea Paula Cozma, Adriana Aniță, Dragoș Aniță, Gheorghe Savuța, 2019- Antibiotic resistance patterns of ESBL and AmpC-producing *E. coli* isolated from slaughtered pigs, *International Scientific Congress „Life sciences, a challenge for the future”*, Ed. Filodiritto, First Edition, vol 1, p. 471-475, ISBN 978-88-85813-63-2.
3. **Marinela TIPIȘCĂ**, Dragoș ANIȚĂ, Ramona GHIORGHIASA, Gabriela URSACHE, Elena IȘAN, Adriana ANIȚĂ, 2019- *Echinococcus granulosus* infection in domestic pig – a case study, *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol.62, nr.4, p. 384-387.
4. **Marinela TIPIȘCĂ**, Andreea Paula COZMA, Dragoș ANIȚĂ, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2020 - Preliminary investigations on prevalence of ESBL-production *Escherichia coli* strains in swine from Botoșani county, *Scientific Papers, Veterinary Medicine Series: Lucrări Științifice Seria Medicină Veterinară, USAMV Iași*, vol. 63, nr.3, p. 310-316.
5. **Marinela TIPIȘCĂ**, Andreea Paula COZMA, Dragoș ANIȚĂ, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2020 - Preliminary results regarding the prevalence of CTX-M genes identified in *E. coli* strains isolated from slaughtered pigs, *Scientific Papers, Veterinary Medicine Series: Lucrări Științifice Seria Medicină Veterinară, USAMV Iași*, vol. 63, nr.3, p. 317-320.
6. **Marinela TIPIȘCĂ**, Andreea Paula COZMA, Dragoș Aniță, Elena IȘAN, Luanda OȘLOBANU, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2021– Preliminary study on phenotypic detection of ESBL and Amp-C β - lactamase-producing *E. coli* isolates from slaughtered pigs, *Bulletin of the University of the Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj- Napoca, Veterinary Medicine*.

COAUTOR:

1. MIHAI Iuliana, TIPISCA Marinela, URSACHE Gabriela, TANASE Oana-Irina, VELESCU Elena, 2017, Kids goitre: case study, *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Vol.60, nr.4, p. 449-453.