

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Titlul tezei de doctorat: "Caracterizarea rezistomului bacterian din unele produse alimentare comercializate pe piața românească de retail".

Cuvinte cheie: *Enterobacteriales*, *Escherichia coli*, antibiorezistență, produse alimentare, sănătate publică.

Teza de doctorat intitulată *Caracterizarea rezistomului bacterian din unele produse alimentare comercializate pe piața românească de retail* cuprinde două părți principale: prima parte reprezintă studiul bibliografic, iar a doua parte prezintă cercetările proprii și rezultatele obținute de-a lungul studiilor doctorale, fiind structurată conform metodologiei academice. Teza conține de asemenea, cuprinsul, introducerea, rezumatul, lista surselor bibliografice, lista abrevierilor, lista figurilor, lista tabelelor și lista publicațiilor.

PARTEA I - *Studiu bibliografic* - Această secțiune introductivă, structurată în trei capitole distincte, cuprinde o sinteză a mecanismelor moleculare și a determinanților genetici care conferă rezistență bacteriilor la agenții antimicrobieni. Se detaliază, în mod particular, genele de rezistență asociate claselor de antibiotice precum aminoglicozidele, β -lactaminele, cloramfenicol, glicopeptidele, fluorochinolonele, tetraciclonele și sulfonamidele. Capitolul final explorează dinamica rezistenței la antibiotice în contextul sectorului alimentar, la scară globală, europeană și națională. Această abordare subliniază implicațiile profunde ale fenomenului asupra siguranței alimentare și a sănătății publice, conturând totodată, provocările majore inerente proceselor de prevenție și control ale acestei probleme în continuă exacerbare.

PARTEA A II-A - *Cercetări proprii și rezultatele obținute* - Această secțiune este alcătuită din trei capitole. Capitolul inițial prezintă contextul instituțional în care s-au derulat investigațiile, definind explicit scopul general și obiectivele specifice ale studiului și este urmat de cel care descrie izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene din produsele alimentare. Capitolele subsecvente se axează pe rezultatele obținute în urma efectuării antibiogramelor și a testelor de biologie moleculară, continuând cu prezentarea fenotipurilor de rezistență și finalizând cu detectarea și caracterizarea genelor de rezistență relevante.

Capitolul 4 detaliază metodologia și rezultatele obținute în urma investigațiilor privind izolarea și identificarea microorganismelor din diverse categorii de produse alimentare. Obiectivul principal al acestei etape a fost evaluarea incidenței contaminării bacteriene la nivelul produselor alimentare de origine vegetală, concretizată prin analiza a 267 de probe de salate preambalate, gata de consum, și a celor de origine animală, incluzând 109 probe de carne de pui, 90 de probe de carne tocată de vită și 90 de probe de brânză proaspătă de vacă.

Protocolul de cultivare și identificare a tulpinilor bacteriene a fost implementat cu rigurozitate, conform standardelor internaționale actuale. Procesul a inclus utilizarea mediilor de cultură selective și diferențiale, fiind completat de aplicarea unor tehnici

avansate de identificare biochimică și fenotipică, utilizând spectrometria de masă MALDI-TOF. Pentru a obține o reprezentare de ansamblu a microbiotei prezente în aceste produse, s-a procedat la izolarea și caracterizarea fenotipică a multiple tulpini bacteriene din fiecare probă analizată.

În urma investigațiilor, au fost identificate un total de 246 de tulpini bacteriene din produsele de origine vegetală, cu o prevalență semnificativă a familiei *Enterobacteriaceae* (n=116). Din produsele lactate au fost izolate 205 tulpini, dintre care 126 au fost clasificate ca aparținând familiei *Enterobacteriaceae*. Carnea de pui a reprezentat o sursă pentru 305 tulpini, 190 dintre acestea aparținând familiei *Enterobacteriaceae*. În final, din carnea tocată de vită au fost izolate 214 tulpini, cu 123 de izolate aparținând aceleiași familii.

Analiza probelor de origine vegetală a relevat o incidență a contaminării cu *Escherichia coli* de 2%, în timp ce *Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis* au fost detectate în 2,4%, respectiv 4,1% din probe. Un procent semnificativ dintre salatele analizate prezentau contaminare microbiologică (60%), indicând un risc potențial pentru siguranța alimentară. Această situație este agravată de lipsa transparenței din partea producătorilor privind originea materiilor prime, informațiile limitându-se adesea la indicații generice. În ciuda diversității denumirilor comerciale și a punctelor de achiziție, o analiză logistică a sugerat o posibilă centralizare a procesării și ambalării salatelor în unități comune, urmată de o diferențiere ulterioară a etichetării. Această ipoteză este susținută de similaritatea rezultatelor microbiologice între diversele tipuri și loturi de salate, sugerând o proveniență comună a materiilor prime.

Pentru produsele din brânză de vacă, datele au indicat o incidență a contaminării cu *E. coli* de 55%, cu *E. faecium* de 2,4% și de 4,1% pentru *E. faecalis*. Carnea de pui a demonstrat cea mai ridicată rată de contaminare cu *E. coli*, atingând la 79,2%, urmată de *E. faecium* (59%) și *E. faecalis* cu un procent identic. În cazul cărnii de vită, s-a înregistrat o rată de contaminare de 57% cu *E. coli*, 50% cu *E. faecium* și 42% cu *E. faecalis*. Pe lângă *E. coli*, au fost identificate și alte specii bacteriene cu potențial patogen, inclusiv *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* și *Acinetobacter baumannii*. Prezența acestor tulpini, multe dintre ele având posibilitatea de a manifesta rezistență la antibiotice, amplifică riscul de infecții severe, în special la subiecții imunocompromiși. Aceste rezultate subliniază că produsele alimentare investigate pot reprezenta un potențial risc pentru sănătatea publică, în special în contextul unor practici de procesare și stocare necorespunzătoare.

De asemenea, pentru a poziționa rezultatele obținute în contextul științific global și a valida relevanța acestora, am inclus în prezentul capitol o analiză comparativă a studiilor similare desfășurate în diverse regiuni geografice.

Această abordare a permis evaluarea corelării și a discordanțelor dintre profilurile de contaminare bacteriană identificate în eșantioanele noastre și cele raportate

la nivel internațional, oferind perspective suplimentare asupra epidemiologiei microorganismelor de interes pentru siguranța alimentară.

Capitolul 5 este dedicat caracterizării fenotipice a profilurilor de rezistență la antimicrobiene pentru tulpinile bacteriene izolate. Determinarea sensibilității a fost efectuată prin tehnica difuzimetrică Kirby-Bauer, utilizând discuri cu concentrații standardizate pentru următoarele antibiotice: Gentamicină (10 µg), Amikacină (30 µg), Ampicilină (10 µg), Piperacilină/Tazobactam (36 µg), Ciprofloxacină (5 µg), Amoxicilină/Acid clavulanic (30 µg), Aztreonam (30 µg), Cloramfenicol (30 µg), Meropenem (10 µg), Moxifloxacină (5 µg), Tigeciclină (15 µg), Cefoxitină (30 µg), Cefotaxim (5 µg) și Trimetoprim/Sulfametoxazol (25 µg). Interpretarea diametrelor zonei de inhibiție a fost realizată în conformitate cu criteriile stabilite de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), procesul de citire fiind automatizat cu ajutorul sistemului ADAGIO (Bio-Rad, SUA).

În cazul celor 108 izolate bacteriene din salate „gata de consum” s-a evidențiat un profil de rezistență la antibiotice complex, cu câteva excepții notabile. S-a observat o rezistență foarte ridicată la peniciline, precum ampicilină (63%) și amoxicilină/acid clavulanic (44,4%), în special la speciile *E. ludwigii* și *K. oxytoca*, dar și o rezistență semnificativă la cefalosporine, cu o prevalență de 37% la cefoxitină. În schimb, rezistența a fost moderată la fluoroquinolone (12%) și scăzută la clase precum aminoglicozide, sub 2%, unde doar două izolate au demonstrat rezistență. Combinația piperacilină-tazobactam a prezentat cu o rată de rezistență de doar 4,6%.

Analiza fenotipică a 103 izolate bacteriene obținute din brânzeturi proaspete de vacă a evidențiat profile de rezistență semnificative. S-a observat o rezistență crescută la antibioticele β-lactamice, cu 76 de izolate (73,8%) rezistente la cel puțin un antibiotic din această clasă. Ratele specifice de rezistență au fost: 69,7% pentru ampicilină și amoxicilină/acid clavulanic la *E. coli* și 100% pentru aceste antibiotice la *K. oxytoca*. Rezistența la piperacilină/tazobactam a fost redusă (2,2%) la *E. coli*, dar semnificativă (50%) la *K. oxytoca*. În cazul aminoglicozidelor, rezistența a atins 27,2% la gentamicină și 2,9% la amikacină. La fluorochinolone - 11,7% dintre izolate au fost rezistente atât la ciprofloxacină, cât și la moxifloxacină. Rezistența la cefalosporine a fost semnificativă - 19,1% dintre izolate fiind rezistente la cefotaxim și/sau cefoxitină. În ceea ce privește alte clase de antibiotice, s-a înregistrat o rezistență ridicată la trimetoprim-sulfametoxazol (35%) și cloramfenicol (27,2%), în timp ce toate izolatele s-au dovedit sensibile la meropenem. Rezistența la tigeciclină a fost detectată la 4,9% dintre izolate.

Analiza fenotipică a 171 de izolate de *Escherichia coli* provenite din carnea de pui a evidențiat un profil de rezistență extins la antimicrobiene. S-a înregistrat o prevalență ridicată a rezistenței la ampicilină (83,6%), trimetoprim-sulfametoxazol (50,3%) și fluorochinolone: ciprofloxacină (68,4%) și moxifloxacină (73,7%). Rezistența la amoxicilină/acid clavulanic a fost de 41,5%, iar la gentamicină de 27,5%.

Rezistența la antibiotice cu spectru restrâns sau combinații cu inhibitori de beta-lactamază a fost mai scăzută: amikacină (6,4%), piperacilină/tazobactam (6,4%) și

cefotaxim (1,2%). Au fost detectate tulpini cu rezistență la antibiotice de importanță critică, precum tigeciclina (11,7%). Studiul a identificat modele de co-rezistență, cu 38% dintre izolate rezistente concomitent la ampicilină și amoxicilină/acid clavulanic, și 57% rezistente la ambele fluorochinolone testate. Aceste rezultate indică prezența unor mecanisme complexe de rezistență și un potențial risc de transmitere a acestora.

În cazul celor 87 de izolate bacteriene provenite din carnea tocată de vită, analiza fenotipică a evidențiat un profil de rezistență eterogen la antimicrobiene. S-a observat o prevalență ridicată a rezistenței la antibioticele β -lactamice (peste 30%), în special la ampicilină și amoxicilină/acid clavulanic. În schimb, rata de rezistență la piperacilină/tazobactam a fost mai scăzută (9,2%). Rezistența la aminoglicozide a fost limitată, cu 12,6% izolate rezistente la gentamicină și nicio tulpină cu rezistență detectată la amikacină. La fluorochinolone, prevalența rezistenței a fost moderată: 5,7% la ciprofloxacină și 9,2% la moxifloxacină. Rezistența la cefalosporine de generația a III-a a fost prezentă la 9,2% dintre izolate pentru cefotaxim și 12,6% pentru cefoxitin. În ceea ce privește alte clase de antibiotice, s-a înregistrat o rezistență semnificativă la trimetoprim-sulfametoxazol (34,5%) și cloramfenicol (12,6%). Toate izolatele s-au dovedit sensibile la meropenem și aztreonam, iar rezistența la tigeciclina a fost minoră (3,4%). Aceste rezultate indică prezența unor mecanisme de rezistență selectivă în comunitățile bacteriene din carnea de vită.

Analiza enterococilor izolați din produse alimentare a evidențiat o prevalență eterogenă a rezistenței la vancomicină, cu variații semnificative între specii și produsele alimentare analizate. În salatele „gata de consum”, *Enterococcus faecium* a prezentat cea mai mare rată de rezistență (33,3%, 2/6 izolate), urmat de *E. casseliflavus* și *E. faecalis* (30,0%, 3/10 fiecare). În schimb, *E. hirae* a înregistrat o prevalență redusă (3,4%, 2/59). În brânză, rezistența a fost detectată la *E. faecium* (18,2%, 2/11) și *E. faecalis* (12,2%, 6/49). În carnea de pui, prevalența a fost de 9,0% pentru *E. faecium* (4/49) și 12,0% pentru *E. faecalis* (6/48). În carnea tocată de vită, ratele au fost mai scăzute: 10,0% pentru *E. faecium* (5/45) și 8,0% pentru *E. faecalis* (3/39).

Analiza bacteriilor izolate din salatele „ready-to-eat” a evidențiat prezența unor specii cu potențial patogen și fenotipuri de rezistență multiplă la antibiotice, în special la beta-lactamine, fluorochinolone și tetraciclina. Rezistența redusă la aminoglicozide poate fi explicată prin limitările biologice ale acestor antibiotice, costurile metabolice asociate mecanismelor de rezistență și restricțiile legislative privind utilizarea lor în zootehnie, în timp ce prevalența ridicată a rezistenței la beta-lactamine reflectă utilizarea lor intensă.

În capitolul 6, cercetarea se concentrează pe caracterizarea moleculară a mecanismelor de rezistență la antimicrobiene pentru un lot de 24 de izolate bacteriene, în principal *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae*, provenite din diverse produse alimentare de origine animală și vegetală.

Identificarea taxonomică de precizie a fost realizată prin tehnologia MALDI-TOF MS, obținându-se scoruri de corelație ridicate (>2.0) care au asigurat acuratețea speciilor determinate înainte de screening-ul molecular. Rezultatele, centralizate sub forma unui heatmap cu clustering ierarhic, au evidențiat o prevalență remarcabilă a determinanților de rezistență, confirmând genotipic profilurile fenotipice de multirezistență observate anterior.

Analiza a relevat un grup majoritar de probe, dominat de izolate de *E. coli* din carne, caracterizat prin prezența universală a genelor *blaTEM* și *sul1* (100%), adesea asociate cu *blaCTX-M*, *aac-6-Ib* și *qnrB*, fapt ce sugerează diseminarea unor plasmide multirezistente în lanțul alimentară.

În contrast, izolatele de *K. pneumoniae* din lactate au prezentat o specializare adaptativă prin deținerea genelor *blaSHV* și *oqxB*, în timp ce tulpina de *Enterobacter ludwigii* din salată a demonstrat un risc critic prin prezența genei *qnrS* într-un produs consumat fără tratament termic.

Deși s-a observat o acumulare îngrijorătoare de gene de tip PMQR și ESBL, absența totală a carbapenemazelor KPC, OXA-48, MBL confirmă menținerea acestor antibiotice ca opțiuni de rezervă, în acord cu tendințele raportate de EFSA.

Discuțiile subliniază fenomenul de co-selecție robustă, unde presiunea selectivă exercitată de sulfonamide menține indirect genele de rezistență la cefalosporine, transformând alimentele în vectori de diseminare a rezistenței în cadrul abordării "One Health".