

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: MICROBIOLOGIE-IMUNOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. Mihai Carp-Cărare**

**Doctorand,
Cozma Andreea Paula**

2017

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: MICROBIOLOGIE-IMUNOLOGIE

***“Determinarea riscului de portaj și a direcției de transmitere
a enterobacteriaceelor producătoare de ESBL la animalele
de companie și proprietarii acestora”***

Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. Mihai Carp-Cărare

Doctorand,
Cozma Andreea Paula

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE
THE "ION IONESCU DE LA BRAD" - IASI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: MICROBIOLOGY-IMMUNOLOGY**

DOCTORAL THESIS

**PhD Manager,
PhD, Prof. Mihai Carp-Cărare**

**PhD student,
Cozma Andreea Paula**

2017

UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE
THE "ION IONESCU DE LA BRAD" - IASI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: MICROBIOLOGY-IMMUNOLOGY

Determining the prevalence and risk of acquiring ESBL-producing enterobacteriaceae in companion animals and in-contact humans in Romania

PhD Manager,
PhD, Prof. Mihai Carp-Cărare

PhD student,
Cozma Andreea Paula

“Tot ce sunt sau ce sper să devin îi datorez îngerului care a fost mama.”

Abraham Lincoln

*Cu neprețuită recunoștință și iubire,
Mamei mele*

CUPRINS

INTRODUCERE.....	11
REZUMAT	17
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	25
CAPITOLUL I. PRINCIPALELE CARACTERISTICI ALE ENZIMELOR BETALACTAMAZE CU SPECTRU EXTINS (ESBL) ȘI IMPLICAȚIILE LOR ASUPRA SĂNĂTĂȚII PUBLICE	26
1.1. Istoricul și originea ESBL	26
1.2. Clasificarea funcțională și moleculară a ESBL	30
1.3. Modalități de transmitere a enzimelor ESBL	32
1.4. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL asociate cu infecții umane	35
1.5. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL la animale	41
1.6. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL în România	43
1.7. Rezistența tulpinilor bacteriene la acțiunea fluorochinolonelor	45
1.8. Implicațiile asupra sănătății publice	46
CAPITOLUL II. METODELE FENOTIPICE ȘI GENOTIPICE DE DETECȚIE A TULPINILOR PRODUCĂTOARE DE ESBL.....	50
2.1. Metode fenotipice de identificare a tulpinilor producătoare de ESBL	50
2.2. Metode genotipice utilizate pentru identificarea markerilor de rezistență la antibiotice la tulpinile producătoare de ESBL	55
2.2.1. Tehnica PCR și secvențierea	55
2.2.2. Identificarea plasmidelor bacteriene prin tehnica PCR Based replicon typing (PBRT)	58
2.2.3. Experimente de transmitere genetică prin conjugare (sexducție).....	58
2.2.4. Tehnica de amplificare randomizată a ADN ului polimorfic (RAPD) și Electroforeza în câmp pulsatoriu (PFGE).....	60
2.2.5. Tehnica MLST-Multilocus sequence typing	61

PARTEA A II A - CERCETĂRI PROPRII.....	62
CAPITOLUL III. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	63

CAPITOLUL IV. SCREENING-UL FENOTIPIC PENTRU DETECȚIA TULPINILOR DE ENTEROBACTERII PRODUCĂTOARE DE ESBL	65
4.1. Recoltarea probelor	65
4.2. Screening-ul ESBL utilizând un mediu cromogen înalt selectiv.....	66
4.3. Identificarea tulpinilor de enterobacterii obținute în urma screening-ului ESBL	67
4.4. Confirmarea fenotipică a tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL	69
4.5. Caracterizarea fenotipului de rezistență a tulpinilor producătoare de ESBL la alte clase de antibiotice.....	70
4.6. Rezultate și discuții.....	72
4.6.1. Rezultate și discuții aferente screening-ului ESBL.....	72
4.6.2. Rezultate și discuții privind încadrarea taxonomică a tulpinilor de enterobacterii izolate	73
4.6.3. Rezultate și discuții privind confirmarea fenotipică a tulpinilor producătoare de ESBL de origine animală și umană.....	74
4.6.4. Rezultate și discuții privind caracterizarea fenotipului de rezistență al tulpinilor producătoare de ESBL la alte clase de antibiotice.....	75
4.7. Concluzii parțiale	80

CAPITOLUL V. IDENTIFICAREA PRINCIPALELOR GENE IMPLICATE ÎN APARIȚIA ȘI TRANSMITEREA REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICELE BETA-LACTAMICE.....	81
5.1. Material și metodă.....	81
5.1.1 Identificarea principalelor gene ce codifică producția enzimelor ESBL.....	81
5.1.2 Identificarea principalelor gene ce codifică rezistența la fluorochinolone și colistin	86
5.2. Investigarea profilului plasmidial al tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL.....	89
5.2.1. Material și metodă	89
5.3. Rezultate și discuții.....	92
5.3.1. Identificarea principalelor gene codante ce codifică enzimele ESBL..	92
5.3.2 Identificarea principalelor gene codante ce codifică rezistența la fluorochinolone și colistin.....	100

5.3.3. Identificarea plasmidelor bacteriene implicate în transmiterea enzimelor ESBL	103
5.3.4. Experimentul de conjugare.	114
5.4. Concluzii parțiale	117
 CAPITOLUL VI. DETERMINAREA GRADULUI DE OMOLOGIE GENETICĂ ÎNTRE TULPINILE PRODUCĂTOARE DE ESBL DE ORIGINE ANIMALĂ ȘI UMANĂ	
6.1. Material și metodă.....	118
6.1.1. Încadrarea în grupuri filogenetice	118
6.1.2. Identificarea clonei O25-ST131	120
6.1.3. Evaluarea gradului de înrudire genetică utilizând tehnica de amplificare randomizată a ADN-ului polimorfic (RAPD)	122
6.2. Rezultate și discuții.....	123
6.2.1. Încadrarea în grupuri filogenetice	123
6.2.2. Identificarea clonei O25-ST131.	126
6.2.3. Evaluarea gradului de înrudire genetică utilizând tehnica RAPD	128
6.3. Concluzii parțiale	132
 CAPITOLUL VII. CONCLUZII FINALE, LIMITELE STUDIULUI ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE	
BIBLIOGRAFIE	141
 ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI.....	162
 ANEXA 2. LISTA TABELELOR	164
 ANEXA 3. LISTA FIGURILOR.....	168
 ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	172

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
SUMMARY	17
PART I - THE PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE.....	25
CHAPTER I. THE MAIN FEATURES OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES ENZYMES (ESBL) AND THEIR IMPLICATIONS FOR PUBLIC HEALTH.....	26
1.1. The history and origin of ESBL.....	26
1.2. Functional and Molecular Classification of ESBL.....	30
1.3. Transmission of ESBL positive bacterial strains.....	32
1.4. Spread and distribution of ESBL positive bacterial strains associated with human infections	35
1.5. Spread and distribution of ESBL positive bacterial strains in animals	41
1.6. Spread and distribution of ESBL positive bacterial strains in Romania.....	43
1.7. Resistance of bacterial strains to fluoroquinolones.....	45
1.8. Implications for public health.....	46
CHAPTER II. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS FOR THE DETECTION OF ESBL POSITIVE STRAINS	50
2.1. Phenotypic methods for detecting strains producing ESBL	50
2.2. Genotypic methods used to detect antibiotic resistance markers in ESBL producing strains	55
2.2.1. PCR technique and sequencing	55
2.2.2. Identification of bacterial plasmids by PBRT technique (PCR Based Replicon typing)	58
2.2.3. Genetic transmission experiments by conjugation (sexduction).....	58
2.2.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Puls field gel electrophoresis (PFGE).....	60
2.2.5. Multilocus sequence typing technique (MLST).....	61

PART II - PERSONAL CONTRIBUTION	62
CHAPTER III. AIM AND OBJECTIVES OF THE THESIS	63
 CHAPTER IV. PHENOTYPIC SCREENING FOR THE DETECTION OF POSITIVE ESBL <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> STRAINS.....	65
4.1. Sample collection.....	65
4.2. The ESBL Screening using a highly selective chromogenic medium	66
4.3. Identification of <i>Enterobacteriaceae</i> strains obtained from ESBL screening.....	67
4.4. Phenotypic confirmation of <i>Enterobacteriaceae</i> strains producing ESBL	69
4.5. Characterization of the resistance phenotype of ESBL strains in other classes of antibiotics	70
4.6. Results and discussions	72
4.6.1. Results and discussion of ESBL screening.....	72
4.6.2. Results and discussions on the taxonomic classification of the isolated <i>Enterobacteriaceae</i>	73
4.6.3. Results and discussions on the phenotypic confirmation of ESBL strains isolated from animal and human.	74
4.6.4. Results and discussions on the characterization of ESBL strain resistance in other classes of antibiotics.....	75
4.7. Partial conclusions	80
 CHAPTER V. DETECTION OF THE MAIN GENES INVOLVED IN THE EMERGENCE AND TRANSMISSION OF RESISTANCE TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS.....	81
5.1. Material and method	81
5.1.1. Identification of the main genes encoding ESBL enzymes.....	81
5.1.2. Identification of main genes encoding resistance to fluoroquinolones and colistin	86
5.2. Investigation of plasmid profile of <i>Enterobacteriaceae</i> producing ESBL	89
5.2.1. Material and method.....	89
5.3. Results and discussions	92
5.3.1. Identification of the main genes encoding ESBL enzymes.....	92
5.3.2 Identification of main genes encoding resistance to fluoroquinolones and colistin	100

5.3.3. Investigation of plasmid profile of <i>Enterobacteriaceae</i> producing ESBL.....	103
5.3.4. Conjugation experiment.....	114
5.4. Partial conclusions	117
CHAPTER VI. DETERMINATION OF DEGREE OF GENETIC HOMOLOGY BETWEEN POSITIVE ESBL STRAINS ISOLATED FROM ANIMAL AND HUMAN	118
6.1. Material and method	118
6.1.1. Assignment into phylogenetic groups	118
6.1.2. O25-ST131 clone identification.....	120
6.1.3. Evaluating the degree of genetic association using the RAPD technique	122
6.2. Results and discussions	123
6.2.1. Assignment into phylogenetic groups	123
6.2.2. O25-ST131 clone identification.....	126
6.2.3. Evaluating the degree of genetic association using the RAPD technique	128
6.3. Partial conclusions	132
CHAPTER VII. FINAL CONCLUSIONS, LIMITATIONS OF THIS STUDY AND RESEARCH PERSPECTIVE	133
REFERENCES	141
ANNEX 1. ABBREVIATION LIST	162
ANNEX 2. LIST OF TABLES.....	164
ANNEX 3. LIST OF FIGURES	168
ANNEX 4. SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED	172

INTRODUCERE

Antibioticele sunt compuși ce au revoluționat lumea medicală, având acțiune directă asupra bacteriilor și fiind utilizate pentru tratamentul sau prevenirea infecțiilor bacteriene atât la om cât și la animale.

Rezistența la antibiotice este un fenomen biologic vechi ce a evoluat odată cu producția de antibiotice din mediul natural. Cu mult înainte de introducerea antibioticelor moderne, bacteriile au dezvoltat mecanisme de apărare împotriva antibioticelor naturale produse de ciuperci în mediu. Odată cu apariția antibioticelor moderne și cu utilizarea lor pe scară largă și uneori irațională, mecanismele de apărare dezvoltate de bacterii au devenit complexe, astăzi antibio rezistența fiind un adevărat fenomen ce preocupă lumea științifică internațională.

La scară mondială, antibioticele de primă intenție în tratamentul bolilor infecțioase atât în medicina umană cât și în medicina veterinară sunt cele din clasa beta-lactamine. Utilizarea pe scară largă a acestor substanțe antimicrobiene a dus la exercitarea unei presiuni de selecție în dezvoltarea antibio rezistenței,

La bacteriile din familia *Enterobacteriaceae*, enzimele beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) sunt mecanismul de rezistență cel mai important atât din punct de vedere clinic, cât și din punct de vedere economic, deoarece acestea hidrolizează și inactivează antibioticele beta-lactamice, atât de uzitate și în medicina veterinară dar și în medicina umană. Din considerente genetice, prezența acestor enzime la diferite tulpini bacteriene este asociată cu rezistența și la alte clase de antibiotice non-beta-lactamice cum ar fi fluoroquinolone, aminoglicozide și trimetoprim-sulfometoxazol. În condițiile menționate anterior, tratamentul în cazul infecțiilor cauzate de bacterii purtătoare de enzime ESBL este limitat (Nóbrega ș.a.,2014).

În ultimul deceniu, ca urmare a creșterii rapide și la scară largă a emergenței infecțiilor cauzate de bacterii producătoare de ESBL, atenția a fost îndreptată către stabilirea unor corelații între enzimele ESBL de origine umană și cele de origine animală, presupunându-se că animalele de rentă, animalele de companie și păsările migratoare ar putea constitui un potențial rezervor pentru difuzarea și menținerea genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL. În zilele noastre, există o coabitare strânsă între animale și om, iar utilizarea acelorași agenți antimicrobieni atât în terapia bolilor infecțioase în medicina umană cât și în medicina veterinară, precum și prezența acestor gene pe elemente genetice foarte mobile ce le asigură transferul cu ușurință nu doar intraspecie cât și interspecie, constituie argumente importante pentru susținerea și răspândirea cu rapiditate și lejeritate a acestor enzime. În plus, mai multe bacterii Gram-negative,

ce au impact clinic și economic în medicina veterinară pot provoca infecții la om (Nóbrega ș.a.,2014).

Subiectul propus prezintă un interes deosebit, deoarece ar putea oferi un răspuns despre cât de comun este portajul *Enterobacteriaceaelor* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins în efectivele de animale de companie și comunitare în zona de nord-est a României și dacă aceștia pot fi considerați o sursă de enterobacterii producătoare de ESBL pentru om, prin intermediul coabitării strânse dintre animalele de companie și proprietarii lor.

Pornind de la numeroasele studii făcute la nivel internațional pentru a demonstra prezența *Enterobacteriaceaelor* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins la animalele de companie, precum și statutul de rezervor al acestora pentru proprietari, considerăm că o astfel de cercetare este necesară deoarece va genera un set de date valoroase din punct de vedere epidemiologic.

În prezent, în România doar tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL de origine umană au fost analizate și studiate, iar în ceea ce privește tulpinile de origine animală și implicațiile lor asupra sănătății umane au fost studiate doar izolatele de la pui. În concluzie, cercetarea propusă este una de actualitate ce își propune să realizeze o hartă a distribuției genetice a tulpinilor producătoare de ESBL din nord-estul României.

Cu recunoștință, alese multumiri și gânduri deosebite mă întorc către o serie de persoane cheie fără de care nu aș fi reușit să ating toate obiectivele propuse pentru acest studiu.

Mulțumesc conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" pentru asigurarea cadrului organizatoric necesar în vederea desfășurării cercetărilor și validării rezultatelor obținute.

Alese multumiri și recunoștință dl. Prof. univ. dr. Mihai Carp-Cărare pentru onoarea de a accepta să mi fie conducător de doctorat, pentru îndrumarea științifică, înțelegerea și sfaturile părintești oferite pe parcursul celor 4 ani de doctorat.

Mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare și membrilor comisiei de doctorat pentru amabilitatea și onoarea de a accepta analizarea tezei.

Gânduri deosebite și mulțumiri titularilor de la disciplinele Microbiologie și Imunologie (Conf. univ. dr. Eleonora Guguianu, Dr. Cristina Rîmbu, Șef lucr. dr. Cristina Horhoge, Conf. univ. dr. Cătălin Carp-Cărare) pentru înțelegerea, îndrumarea și disponibilitatea arătată pe parcursul perioadei doctorale.

Sincere mulțumiri, respect și recunoștință celor două persoane cheie a căror contribuție a fost esențială pentru investigațiile realizate pe subiectul propus: dna Conf. univ. dr. Dorina Timofte și dna dr. Iuliana Măciucă. Vă sunt profund recunoscătoare și vă mulțumesc pentru încrederea, înțelegerea, transparența, răbdarea și suportul profesional și moral oferit pe parcursul celor două stagii

doctorale. De asemeni, mulțumesc echipei de la Laboratorul de Microbiologie al Universității din Liverpool pentru amabilitatea și colegialitatea arătate.

Mulțumesc colegelor de birou Irina și Oana pentru suportul, ajutorul prietenia și încrederea oferită pe parcursul anilor petrecuți împreună.

Prietenelor Ioana, Daniela și Luciana-Alexandra, dragele mele vă mulțumesc pentru umărul oferit atunci când am avut mai mare nevoie, pentru zâmbetul adus pe chip atunci când nimic nu părea să funcționeze, pentru timpul de calitate petrecut împreună și mai ales pentru prietenia oferită necondiționat.

Tuturor prietenilor vă mulțumesc pentru că ați știut să-mi ridicați moralul în timpul liber, că prin exemplul reușitelor voastre m-ați ambiționat să îmi doresc și eu mai mult.

Mulțumirile mele se îndreaptă și către omul care deși uneori mai ferm, alteori cu căldura omului care îți dorește binele a fost alături de mine și m-a determinat să mă autodepășesc în tot ce mi-am propus și a contribuit la cea care sunt astăzi făcându-mă un om mai puternic: Răzvan.

Nimic în viață nu poate exista fără credință în Dumnezeu și fără binecuvântarea sfântă a Lui. Îi mulțumesc pentru mintea luminată atunci când a trebuit să iau decizii importante, pentru sănătatea cu care m-a binecuvântat, pentru oamenii minunați pe care mi-i-a scos în cale, pentru valul de lumină, Soare și speranță pe care le-a sădit în sufletul meu.

Nu în ultimul rând, mă întorc cu toată recunoștința către cel mai important om din viața mea: mama. Îți mulțumesc pentru educația, exemplu de omenie, bunătate, dăruire și iubire necondiționată pe care mi le-ai oferit constant. Îți mulțumesc pentru că nu ai spus niciodată "nu", pentru că nu doar că m-ai lăsat să zbor, ci mi-ai dat aripi și ai fost motorul ce m-a determinat să îmi doresc să reușesc în viață. Te iubesc și nu îmi ajung cuvintele să îți mulțumesc pentru tot.

INTRODUCTION

Antibiotics are substances that have revolutionized modern medicine with their direct action against bacteria and are currently being used for treatment and prevention of bacterial infections, in both human and animal patients.

Antibiotic resistance is an old biological phenomenon that has evolved alongside the production of antibiotics in the natural environments. Long before the introduction of modern antibiotics, bacteria developed defense mechanisms against natural antibiotics produced by fungi in the environment. With the emergence of modern antibiotics and their widespread and sometimes irrational usage, the defense mechanisms developed by bacteria have become complex, and today antibiotic resistance is a phenomenon of real concern to the international scientific world.

Beta-lactams are the first-line antibiotic used worldwide in the treatment of infectious diseases, in both human and veterinary medicine. The widespread use of these antimicrobial agents resulted in exerting a selection pressure, thus to the development of antibiotic resistance.

For the family, the *extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)* enzymes represent the most important mechanism of resistance, from both clinical and economical point of view, because they hydrolyze and inactivate beta-lactam antibiotics, commonly used in veterinary and human medicine. For genetic reasons, the presence of these enzymes in different bacterial strains is associated with resistance to other classes of non-beta-lactam antibiotics such as fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim-sulfamethoxazole. Given these circumstances, the treatment for infections caused by ESBLs enzyme-bearing bacteria is limited (Nóbrega et al., 2014).

In the last decade, the research has been focused on establishing correlations between ESBL enzymes of human and animal origin, given the increasingly widespread infections caused by positive ESBL bacteria and assuming that farm animals, pets and migratory birds could be a potential reservoir for the diffusion and maintenance of resistance genes encoding ESBLs. The close cohabitation between animals and humans, the use of the same antimicrobial agents in the therapy of infectious diseases in human medicine, as well as in veterinary medicine, and the presence of these genes on highly mobile genetic elements that ensure easy transfer not only intraspecies, but also interspecies, are important arguments sustaining the rapid spreading of these enzymes. In addition, several Gram-negative bacteria, with clinical and economic impact in veterinary medicine can cause infections in humans (Nóbrega et al., 2014).

The proposed topic is of particular interest, given the fact that it could provide an answer as to how common is the detection of producing broad-spectrum beta-lactamases in stray animals and pets, in the northeastern region of Romania, and whether they can be considered a source of ESBL producing for humans, through close cohabitation between pets and their owners.

Based on numerous internationally conducted studies, demonstrating the presence of producing extended-spectrum beta-lactamases in pet animals as well as their reservoir status for owners, we believe that the present research is necessary, as it will generate valuable epidemiological data.

To date, in Romania, only positive ESBL strains of human origin were studied, and in terms of animal strains and their implications on human health, only chicken isolates have been analyzed. In conclusion, the proposed research is a topical one, that aims to creating a genetic distribution map of the ESBL positive strains, in northeastern Romania.

I express my gratitude and special thanks to a number of key people without whom I would not have been able to achieve all the proposed goals.

I would like to thank the management of the University of Applied Life Sciences and Environment "Ion Ionescu de la Brad", for ensuring the necessary organizational framework for carrying out the research and validation of the obtained results.

Chosen thanks and gratitude to Prof. univ.dr. Mihai Carp-Cărare for the honor of accepting to be my PhD supervisor, for the scientific guidance, understanding and parental advice offered during the four-year PhD study period.

I would like to thank the members of the directorial board and the doctoral committee, for the courtesy and honor to accept the thesis.

I would also like to give special thoughts and thanks to the academic staff of the Microbiology-Immunology Department (Associate Professor Dr. Eleonora Guguianu, Dr. Cristina Rîmbu, Assistant professor Dr. Cristina Horhoge, Associate Professor Dr. Cătălin Carp-Cărare) for understanding, guidance and availability during the doctoral studies period.

I greatly appreciate and respect the two key people whose contribution has been essential for investigations on the proposed topic: Senior lecturer dr. Dorina Timofte and Dr. Iuliana Maciucă. I am deeply grateful and thank you for the trust, understanding, transparency, patience and for the professional and moral support, offered during the two doctoral internships. I also thank the team of the University of Liverpool's Microbiology Laboratory, for the kindness and the collegiality offered.

I also want to take a moment to thank my colleagues, Irina and Oana, for their support, help, friendship and trust over the years spent together.

To my dear friends, Ioana, Daniela and Luciana-Alexandra, thank you for the shoulder offered when I needed it the most, for the smile brought to my face

when nothing seemed to work, for the quality time spent together and especially for the unconditional friendship offered.

To all of my friends, thank you for always knowing how to boost my morale, and for making me wish for more, by your own example of success.

My thanks go also to Razvan, the man who, sometimes firmly, sometimes with the warmth of one who has your best interest at heart, stood by me and gave me the motivation to surpass my limits, having in this way a strong contribution to the strong person I am today.

Nothing in life can exist without faith in God and without His holy blessing. I am grateful for the enlightening mind He gave me when I had to take important decisions, for the health He blessed me with, for the wonderful people he brought in to my life, for the wave of light, the Sun and the hope that he planted in my soul.

Last but not least, I return with all my gratitude to the most important person in my life: my mother. Thank you for the education you gave me, for the example of humanity, compassion, kindness, dedication and unconditional love that you have given me constantly. Thank you for never saying "no" to me, because you did not just let me fly, but you also gave me wings. Thank you for being the engine that made me want to succeed in my life. I love you and words can't express the amount of gratitude I have towards you.

REZUMAT

Teza de doctorat cu titlul "Determinarea riscului de portaj și a direcției de transmitere a *enterobacteriaceelor* producătoare de ESBL la animalele de companie și proprietarii acestora" conține un număr de 174 pagini și este structurată conform uzanțelor în două părți: prima parte care cuprinde "Stadiul actual al cunoașterii" și partea a doua ce cuprinde cercetările proprii pe tema propusă.

Prima parte cuprinde 36 pagini și prezintă sintetic pe parcursul a două capitole principalele date bibliografice necesare pentru o bună înțelegere a subiectului propus fiind descrise informații cu privire la principalele caracteristici ale enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins și implicațiile acestor enzime asupra sănătății publice. Cel de al doilea capitol din prima parte cuprinde informații cu privire la metodele fenotipice și genotipice de detecție a tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL.

Partea a doua a tezei are 138 pagini și cuprinde informații cu privire la cercetările proprii fiind structurată în 5 capitole principale ce redau scopul și obiectivele subiectului propus, rezultatele obținute în urma investigațiilor fenotipice și moleculare realizate pe tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL izolate din materiile fecale ale animalelor de companie și ale proprietarilor sau personalului sanitar veterinar. De asemenea tot în partea a doua a tezei sunt prezentate rezultatele privind diversitatea și gradul de omologie genetică a tulpinilor bacteriene analizate. De asemenea fiecare capitol descrie materialele și metoda de lucru pentru fiecare investigație realizată și concluziile parțiale aferente.

Lucrarea cuprinde un număr de 30 figuri, 27 tabele și a fost realizată pe baza a 287 de titluri bibliografice.

Capitolul III cuprinde "*Scopul și obiectivele tezei*". Ipoteza principal de testat este dacă animalele de companie pot constitui un rezervor de enterobacterii producătoare de ESBL pentru proprietari sau personalul sanitar veterinar.

Obiectivele principale ale acestei cercetări au fost:

- izolarea și identificarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la cele două categorii de subiecți analizați;
- confirmarea fenotipică a izolatelor prezumtiv ESBL prin metoda discurilor combinate;
- caracterizarea fenotipului de rezistență la alte clase de antibiotice ale tulpinilor confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL;
- analiza moleculară a probelor pozitive la screening-ul ESBL pentru caracterizarea genelor prezente la tulpinile de origine animală și umană analizate;

- caracterizarea moleculară a tulpinilor producătoare de ESBL izolate în vederea identificării genelor ce determină rezistența la fluorochinolone;
- identificarea tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele ce codifică enzimele ESBL;
- analiza diversității genetice a tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie și cele izolate de la proprietari/personal sanitar veterinar folosind tehnica RAPD;
- realizarea unui experiment de conjugare pentru a confirma transmiterea genelor ce codifică enzimele ESBL de către plasmidele identificate.

Capitolul IV „*Screening-ul fenotipic pentru detecția tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL*”. Au fost recoltate și prelucrate 279 probe de materii fecale recoltate steril (228 de origine animală și 51 de origine umană). În urma screening-ului ESBL au fost izolate 117 tulpini de enterobacterii prezumtiv ESBL (81 de origine animală și 36 de origine umană). Încadrarea taxonomică a izolatelor s-a realizat prin identificarea genelor *bla_{uidA}* și *bla_{uspA}* pentru *E.coli* și pe baza unor caractere biochimice minime pentru speciile de *Klebsiella pneumoniae* și *Proteus spp.* Investigațiile au arătat că cele 117 tulpini analizate aparțin în proporție de 88,89% speciei *E.coli*, 5,98% speciei *Klebsiella pneumoniae* și 5,13% speciei *Proteus spp.*.

Tot în acest capitol au fost realizate și investigațiile pentru confirmarea fenotipică a izolatelor obținute în urma screening-ului ESBL. Din cele 117 tulpini, 63 (53,84%) au fost confirmate ca fiind ESBL prin metoda discurilor combinate. Restul tulpinilor neconfirmate fenotipic pot prezenta simultan și un alt mecanism de rezistență care să mascheze fenotipul ESBL și să conducă la rezultate fals negative. Pe baza acestor considerente, toate cele 117 izolate prezumtiv ESBL au fost testate în vederea caracterizării substratului molecular de rezistență la antibiotice.

Un ultim subcapitol din capitolul IV a cuprins investigații realizate în vederea determinării fenotipului de rezistență la alte clase de antibiotice pentru tulpinile confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL. Testarea sensibilității s-a realizat prin metoda difuzimetrică, fiind determinată sensibilitatea la 9 antibiotice din 7 clase diferite: beta-lactamine, fluorochinolone, aminoglicozide, tetraciclina, sulfonamide, carbapeneme, fenicoli. Investigațiile au pus în evidență un grad ridicat de rezistență multiplă la antibiotice (92,85% pentru tulpinile de origine animală și 90,47% pentru izolatele de origine umană). Spre deosebire de tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană au prezentat un nivel crescut al sensibilității la acțiunea amoxicilinei/acid clavulanic. De asemenea toate cele 63 de tulpini prezumtiv producătoare de ESBL pentru care s-a determinat profilul de rezistență au fost sensibile la acțiunea imipenemului.

Capitolul V “*Identificarea principalelor gene implicate în apariția și transmiterea rezistenței la antibioticele beta-lactamice*” descrie investigațiile

moleculare realizate cu scopul de a identifica principalele gene ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, genele ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze, genele ce determină rezistența la fluorochinolone și colistin.

Investigațiile menționate anterior au fost realizate pe cele 117 tulpini izolate în urma screening-ului ESBL și rezultatele pot fi sintetizate astfel:

- pentru cele 81 de izolate de origine animală, în urma investigațiilor moleculare au fost identificate gene ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (70,59%), CTX-M-9 (26,5%), TEM (27,16%), SHV (16,04%), OXA (1,23%) și CIT-M (1,23%).

- pentru cele 36 tulpini bacteriene de origine umană izolate în urma screening-ului ESBL investigațiile moleculare au pus în evidență prezența genelor ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (64,28%), CTX-M-9 (28,57%), TEM (41,67%), SHV (13,89%) și OXA (8,33%). Pentru izolatele de origine umană nu au fost identificate gene ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze.

- pentru izolatele de la animale, rezultatele secvențierii au indicat ca fiind dominante genele ce codifică enzimele CTX-M-14, CTX-M-15 și CTX-M-1.

- în urma secvențierii izolatelor de origine umană au fost dominante genele ce codifică enzimele din grupul CTX-M-14 și CTX-M-15.

Pentru toate izolatele de origine animală obținute în urma screening-ului ESBL a fost determinat procentul de gene codate plasmidial de tip qnr și aac-(6')-lb-cr ce determină rezistența la Quinolone. Grupul de gene dominant a fost qnrS (13,58%), urmat apoi de qnrB și aac-(6')-lb-cr în proporție de 3,7% și qnrA (1,23%).

Pentru cele 36 de izolate de origine umană, investigațiile pentru izolarea genelor de tip qnr și aac-(6')-lb-cr au arătat o prevalență crescută pentru gena qnrS (13,89%), urmată de aac-(6')-lb-cr (5,56%) și qnrB (2,78%). Gena *bla*_{qnrA} nu a fost identificată la izolatele de origine umană.

De asemeni în capitolul V au fost realizate cercetări cu privire la profilul plasmidial al tulpinilor la care au fost identificate markeri de rezistență. Investigațiile au fost realizate prin tehnica PBRT (PCR based replicon typing) și au pus în evidență prezența a 12 plasmide din cele 18 investigate, fiind izolați cu o frecvență crescută atât pentru tulpinile de origine animală cât și pentru tulpinile de origine umană repliconii IncF, IncI1, IncFIB și IncHi2. Plasmida IncN a fost identificată la tulpini de *Escherichia coli* izolate de la animalele de companie, în literatura de specialitate prezența acestui replicon fiind raportată la animalele de companie doar la speciile de *Klebsiella pneumoniae*.

Pentru a demonstra că plasmidele izolate de noi sunt conjugative a fost realizat un experiment de conjugare. În acest sens au fost selectate 16 tulpini CTX-M pozitive și sensibile la acidul nalidixic (12 de origine animală și 4 de origine umană). În urma conjugării au fost obținuți 15 transconjugăți, toți fiind testați prin PCR pentru izolarea genelor de tip *bla*_{CTX-M}. Pentru toți transconjugății

a fost pusă în evidență gena ce codifică enzimele CTX-M, iar repliconii implicați în procesul de transfer de gene au fost Hi2 și I1.

Capitolul VI intitulat "Determinarea gradului de omologie genetică între tulpinile producătoare de ESBL de origine animală și umană" descrie cercetările realizate cu scopul de a încadra tulpinile de *E.coli* identificate în grupuri filogenetice, de a izola tulpinile ce aparțin grupului clonal ST131-O25 și de asemenea investigațiile realizate prin tehnica RAPD pentru a stabili diversitatea și gradul de omologie genetică a tulpinilor ce au alcătuit colecția luată în studiu. Rezultatele cercetării pentru acest capitol pot fi sintetizate astfel:

- grupul filogenetic predominant pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la animale a fost B1 (35,71%);
- pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la proprietari sau personalul sanitar veterinar, grupul filogenetic predominant a fost B2 (35,30%). Portajul fecal cu tulpini din acest grup constituie o problemă de sănătate publică, aceste izolate având un caracter de patogenitate ridicat ce rezultă mai ales din asocierea mai multor caractere de virulență;
- majoritatea tulpinilor de *E.coli* CTX-M pozitive au aparținut grupului filogenetic A;
- au fost izolate 3 tulpini de *E.coli* ST131-O25: o tulpină de origine animală, caracterizată molecular prin prezența genei *bla*_{TEM} și două tulpini de origine umană al căror substrat molecular a fost reprezentat de genele *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6')-Ib-cr} și respectiv *bla*_{CTX-M-9};
- investigațiile RAPD au pus în evidență o mare diversitate genetică între tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană și tulpinile de origine animală și cele de origine umană;
- au fost identificate tulpini de origine animală izolate de la câinii din padocuri sau de la cabinete, caracterizate prin substrat fenotipic și molecular identic sau asemănător ceea ce indică o relație clonală între aceste tulpini și de asemenea că mediul comun al animalelor de la care au fost izolate joacă un rol important în transmiterea acestor tulpini;
- au fost identificate tulpini de *E.coli* izolate de la câine și proprietari, caracterizate prin profiluri fenotipice și genotipice identice (gene ESBL, grup filogenetic identic, același profil RAPD), ceea ce demonstrează că animalele de companie pot constitui un rezervor de bacterii producătoare de ESBL pentru om, genele de rezistență fiind transmise cu ușurință între animale și proprietari prin contactul direct sau indirect.

Capitolul VII „Concluzii finale, limitele studiului și perspective de cercetare” sunt redate principalele aspecte ale cercetării realizate pe tema propusă, aspecte ce sunt sintetizate sub forma a 28 de concluzii.

ABSTRACT

The doctoral thesis entitled *“Determining the risk of carriage and direction of transmission of ESBL-producing enterobacteriaceae in pets and their owners”* has 174 pages and is structured according to the usage, in two parts: the first part which includes *“The current stage of knowledge”* and the second part which includes our own researches on the proposed subject.

The first part has 36 pages and it synthetically presents in two main chapters the reference data necessary for a good understanding of the proposed subject, and information in regard to the main characteristics of extended spectrum beta-lactamase enzymes and the implications of these enzymes on public health are described. The second chapter from the first part includes information about the phenotypic and genotypic methods to detect positive ESBL bacterial strains.

The second part of the thesis has 138 pages and includes information about our own researches and it is structured in 5 main chapters which present the purpose and objectives of the proposed subject, the results obtained following the phenotypic and molecular investigations carried out on the ESBL *enterobacteriaceae* strains isolated from fecal matter of pets and owners or veterinary sanitary personnel. The results regarding the diversity and degree of genetic homology of the analyzed bacterial strains are also presented in the second part of the thesis. Each chapter also describes the materials and work method for each conducted investigation and the related partial conclusions.

The paper has 30 figures, 27 tables, and was carried out based on 287 reference titles.

Chapter II includes the *“Purpose and objectives of the thesis”*. The main hypothesis to be tested is whether pets can represent a reservoir of ESBL *enterobacteriaceae* for the owners or the veterinary sanitary personnel.

The main objectives of this research were:

- isolating and identifying the positive ESBL *enterobacteriaceae* strains isolated from the two categories of analyzed subjects;
- phenotypically confirming the ESBL isolated strains through the combination disc test;
- characterizing the resistance phenotype in other classes of antibiotics of phenotypically confirmed strains as being ESBL;
- molecularly analyzing the positive samples in the ESBL screening for the characterization of genes present in the analyzed animal and human strains;
- molecularly characterizing the isolated ESBL strains in order to identify the genes that determine the resistance to fluoroquinolones;

- identifying the types of plasmids on which genes that codify the ESBL enzymes are found;
- analyzing the genetic diversity of *E. coli* ESBL strains isolated from pets and those isolated from the owners using the RAPD technique;
- conducting a conjugation experiment in order to confirm the transmission of the ESBL genes to the identified plasmids.

Chapter IV “*Phenotypic screening for the detection of positive ESBL enterobacteriaceae strains*”. 279 samples of fecal matter, which were sterilely collected, were collected and processed (228 of animal origin and 51 of human origin). Following the ESBL screening, 117 presumptive ESBL *enterobacteriaceae* strains were isolated (81 of animal origin and 36 of human origin). The taxonomic categorization of the isolated strains was carried out by identifying the *bla_{uidA}* and *bla_{uspA}* genes for *E. coli* and based on some minimum biochemical characteristics for the species of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus spp.* The investigations showed that of the 117 analyzed strains, 88.89% belong to the *E. coli* species, 5.98% to the *Klebsiella pneumoniae* species and 5.13% to the *Proteus spp.*

In this chapter, the investigations for the phenotypic confirmation of isolated strains, obtained following the ESBL screening, were also carried out. Of the 117 strains, 63 (53.84%) were confirmed as being ESBL through the combination disc test. The rest of the phenotypically non-confirmed strains may also simultaneously present another resistance mechanism which could conceal the ESBL phenotype and lead to false negative results. Based on these reasons, all 117 presumptive ESBL isolated strains were tested in order to characterize the molecular resistance substrate to antibiotics.

The last subchapter from chapter IV included investigations carried out in order to determine the resistance phenotype to other classes of antibiotics for the phenotypically confirmed strains as being ESBL. The testing of sensitivity was carried out through the diffusimetric method, and sensitivity was determined in 9 antibiotics from 7 different classes: beta-lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, carbapenems, amphenicols. The investigations revealed a high degree of multiple resistance to antibiotics (92.85% for the animal strains and 90.47% for the human isolated strains). Unlike the animal strains, the human strains presented a high level of sensitivity to the action of amoxicillin/clavulanic acid. Also, all of the 63 presumptive ESBL strains for which the resistance profile was determined were sensitive to the action of imipenem.

Chapter V “*Identification of the main genes involved in the appearance and transmission of resistance to beta-lactam antibiotics*” describes the molecular investigations carried out in order to identify the main genes that codify the extended spectrum beta-lactamase enzymes, the genes that codify the AmpC

beta-lactamase enzymes, and the genes that determine the resistance to fluoroquinolones and colistin.

The above-mentioned investigations were carried out on the 117 isolated strains following the ESBL screening and the results can be synthesized in the following manner:

- for the 81 animal isolated strains, following the molecular investigations, genes that codify the enzymes from the groups: CTX-M-1 (70,59%), CTX-M-9 (26,5%), TEM (27,16%), SHV (16,04%), OXA (1,23%) and CIT-M (1,23%) were identified;

- for the 36 human bacterial strains isolated following the ESBL screening, the molecular investigations revealed the presence of genes that codify the enzymes from the groups: CTX-M-1 (64,28%), CTX-M-9 (28,57%), TEM (41,67%), SHV (13,89%) and OXA (8,33%). For the human isolated strains, no genes that codify the AmpC beta-lactamase enzymes were identified;

- for the animal isolated strains, the results of sequencing indicated that the genes that codify the CTX-M-14, CTX-M-15 and CTX-M-1 enzymes were dominant;

- following sequencing of human isolated strains, the genes that codify the enzymes from the group CTX-M-14 and CTX-M-15 were dominant;

- for all the animal isolated strains obtained following the ESBL screening, the percentage of percentage of *qnr* and *aac*-(6')-Ib-cr plasmid coded genes was determined, which determines the resistance to quinolone. The dominant gene group was *qnrS* (13.58%), followed by *qnrB* and *aac*-(6')-Ib-cr by a ratio of 3.7% and *qnrA* (1.23%);

- for the 36 human isolated strains, the investigations for the isolation of the *qnr* and *aac*-(6')-Ib-cr genes showed a high prevalence for the *qnrS* gene (13.89%), followed by *aac*-(6')-Ib-cr (5.56%) and *qnrB* (2.78%). The *qnrA* gene was not identified in the human isolated strains.

Also in chapter V, researches in regard to the plasmid profile of strains, in which the resistance markers were identified, were carried out. The investigations were carried out through the PBRT (PCR based replicon typing) technique and revealed the presence of 12 plasmids of the 18 that were searched, and the IncF, IncI1, IncFIB and IncHi2 replicons were isolated at a high frequency both for the animal strains and the human strains. Plasmid IncN was identified in strains of *Escherichia coli* isolated from pets; in the specialized literature, the presence of this replicon was reported in pets only in the species of *Klebsiella pneumoniae*.

In order to demonstrate that the plasmids isolated by us are conjugative, a conjugation experiment was carried out. On this line, 16 positive CTX-M strains sensitive to nalidixic acid (12 of animal origin and 4 of human origin) were selected. Following the conjugation, 15 transconjugates were obtained, and all of them were tested through PCR for the isolation of *bla*_{CTX-M} genes. The gene that

codifies the CTX-M enzymes was highlighted for all transconjugates, and the replicons involved in the gene transfer process were Hi2 and I1.

Chapter VI entitled *“Determination of the degree of genetic homology between the animal and human positive ESBL strains”* describes the researches carried out for the purpose of classifying the identified *E. coli* strains into phylogenetic groups, isolating the strains that belong to the ST131 O25 clonal group and also the investigations carried out through the RAPD technique to establish the diversity and degree of genetic homology of strains that made the collection taken into study. The results of the research for this chapter can be synthesized in the following manner:

- the predominant phylogenetic group for the *E. coli* strains isolated from animals was B1 (35.71%);
- for the *E. coli* strains isolated from owners or the veterinary sanitary personnel, the predominant phylogenetic group was B2 (35.30%). The fecal carriage with strains from this group represents a public health problem, these isolated strains having a high pathogenicity character which results particularly from the association of several virulence characters;
- most CTX-M positive *E. coli* strains belonged to the phylogenetic group A;
- three strains of *E. coli* ST131-O25 were isolated: one animal strain, molecularly characterized by the presence of the *bla*_{TEM} gene, and two human strains whose molecular substrate was represented by the *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6)-Ib-cr} and *bla*_{CTX-M-9} genes, respectively;
- the RAPD investigations revealed a high genetic diversity among the animal strains, human strains and animal strains, and the human strains;
- animal strains isolated from dogs from paddocks or practices were identified, characterized by identical or similar phenotypic and molecular substrate, which indicates a clonal relationship between these strains and also that the common environment of the animals from which they were isolated play an important role in the transmission of these strains;
- strains of *E. coli* were identified, isolated in pairs from dog and owners, characterized by identical phenotypic and genotypic profiles (ESBL genes, identical phylogenetic group, the same RAPD profile), which proves that pets can represent a reservoir of ESBL bacteria for humans, the resistance genes being easily transmitted between animals and owners through direct contact.

Chapter VII *“Final conclusions, study limits and research perspectives”* presents the main aspects of the research conducted on the proposed subject, aspects which are synthesized under the form of 28 conclusions.

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII
PART I - THE PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL I. PRINCIPALELE CARACTERISTICI ALE ENZIMELOR BETALACTAMAZE CU SPECTRU EXTINS (ESBL) ȘI IMPLICAȚIILE LOR ASUPRA SĂNĂTĂȚII PUBLICE

CHAPTER I. THE MAIN FEATURES OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES ENZYMES (ESBL) AND THEIR IMPLICATIONS FOR PUBLIC HEALTH

1.1. Istoricul și originea ESBL

Rezistența microorganismelor patogene la acțiunea antibioticelor a devenit o problemă la nivel mondial, atât în medicina umană cât și în medicina veterinară având consecințe grave asupra tratamentului bolilor infecțioase.

Utilizarea abuzivă a antibioticelor în medicina umană sau veterinară, precum și în agricultură contribuie la apariția acestui fenomen, ducând în timp la creșterea alarmantă a numărului de bacterii rezistente la antibiotice ce provoacă fie infecții comunitare, fie nosocomiale (Shaikh ș.a.,2015)

Un interes deosebit se acordă infecțiilor determinate de germeni cu o rezistență multiplă la acțiune antibioticelor, dintre aceștia literatura de specialitate menționează speciile de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* metilicilino rezistent, *Streptococcus pneumoniae* penicilino rezistent și *Enterococcus faecalis* vancomicino rezistent (Aleksun ș.a.,2007).

Tratamentul infecțiilor bacteriene este reprezentat cel mai frecvent de antibioticele beta-lactamice, aceasta fiind cauza principală în apariția antibioretistenței la bacteriile Gram-negative. Expunerea persistentă atât a tulpinilor bacteriene de origine umană cât și de origine animală la o multitudine de antibiotice beta-lactamice a indus producția dinamică și continuă de enzime beta-lactamaze, în timp, acestea extinzându-și activitatea și asupra antibioticelor beta-lactamice noi aparute, fiind denumite enzime beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) (Paterson ș.a.,2005; Pitout ș.a.,2008).

În anul 1988 Jarlier și colaboratorii au folosit pentru prima dată termenul de enzime beta-lactamaze cu spectru extins pentru a caracteriza enzimele ce aveau activitate "extinsă" asupra antibioticelor beta-lactamice comparativ cu activitatea enzimelor beta-lactamaze clasice TEM și SHV.

Enzimele beta-lactamaze cu spectru extins conferă bacteriilor purtătoare rezistență la majoritatea antibioticelor beta-lactamice, inclusiv peniciline, cefalosporine (inclusiv cele de generația a III-a), monobactami, însă nu hidrolizează cefamicinele (cefoxitin și cefotetan) sau carbapenemele (imipenem,

meropenem, ertapenem) și nu inhibă acțiunea inhibitorilor beta-lactamici: acid clavulanic, sulbactam sau tazobactam (Silvia ș.a.,2016; Sridhar, 2015)

Conform studiilor realizate de către Bush K. ESBL-urile sunt enzime a căror viteză a ratei de hidroliză a antibioticelor beta-lactamice cu spectru extins, cum ar fi ceftazidim, cefotaxim sau aztreonam este >10% decât pentru benzilpeniciline (Bush, 2013)

Livermore consideră că toate enzimele care conferă rezistență la antibioticele β -lactamice cu spectru extins ar trebui considerate ESBL, fără a lua în considerare viteza ratei de hidroliză a inelului β -lactamic (Livermore,2008). Spre deosebire de Livermore, Giske CG. propune ca definiția ESBL să cuprindă și enzimele beta-lactamaze de tipul AmpC și carbapenemaze (Giske ș.a.,2009).

Enzimele ESBL au fost detectate în special la membrii familiei *Enterobacteriaceae*, însă au fost izolate și de la non-enterobacterii cum ar fi *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Haemophilus spp.* (Vahaboglu ș.a., 2001; Petroni ș.a., 2002; Tritram ș.a., 2008).

Conform literaturii de specialitate, în anul 1948 Giuseppe Brotzu descoperă cefalosporinele, iar 17 ani mai târziu, în anul 1965 Datta N. și col. descoperă prima beta-lactamază mediată plasmidic TEM-1, izolată de la o tulpină de *E.coli* (Brotzu,2000; Datta,1965). În 1972 Pitton J.S. raportează prima enzimă beta-lactamază de tipul SHV-1 (Pitton,1972).

Utilizarea încă din anii 1980 a oximino-cefalosporinelor în tratamentul infecțiilor grave determinate de bacterii Gram-negative a dus la apariția enzimelor ESBL. Astfel, la 11 ani distanță de raportarea beta-lactamazei SHV-1, în 1983 Knothe și col. izolează prima enzimă beta-lactamază cu spectru extins de tip SHV-2 care derivă din SHV-1, la o tulpină de *Klebsiella ozaenae* (Bradfor, 2001; Knothe,1983).

În anul 1988, Matsumoto Y. raportează existența la o tulpină de *E.coli* a unei noi enzime de tip ESBL, FEC-1 (Fujisawa *E.coli*) ce determină hidroliza cefalosporinei cefotaxim (Matsumoto Y., 1988). Bauernfeind A. și col. descoperă și raportează în anul 1990 prima enzimă ESBL de tip CTX-M-1 (Bauernfeind,1990).

Una dintre enzimele ESBL cel mai des raportată astăzi, CTX-M-15 a fost menționată pentru prima dată în anul 2001 de către Karim A. și col. (Karim ș.a.,2001).

În anul 2008, pentru prima dată Nicolas-Chanoine și col. încadrează tulpinile de *E.coli* producătoare de ESBL tipul CTX-M ca aparținând grupului clonal ST131, serogrupul O25 (Nicolas-Chanoine ș.a., 2008).

Datele prezentate anterior cu privire la istoria și originea apariției primelor enzime beta-lactamaze și implicit și a primelor beta-lactamaze cu spectru extins, precum și a raportărilor notabile pe acest segment științific au fost sintetizate și prezentate schematic în figura 1.1.

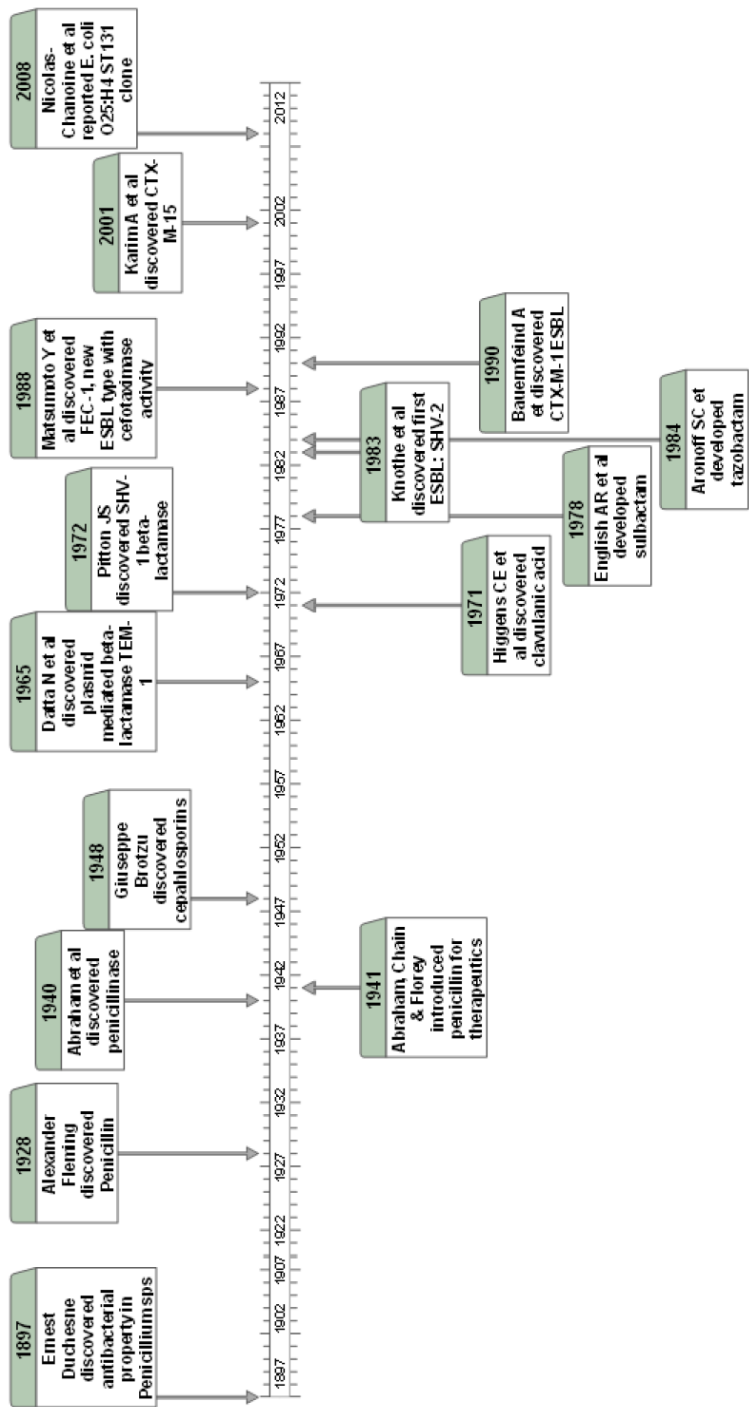


Fig. 1.1. Repere importante în apariția și evoluția enzimelor beta-lactamaze ce determină rezistența la antibiotice

Fig. 1.1. Significant milestones in the emergence and evolution of beta-lactamase enzymes that determine resistance to antibiotics
(Sridhar Rao, 2015)

Originea enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins diferă în funcție de tipul acestora. Astfel, cele de tipul SHV își au originea în gena *bla_{SHV}* ce se găsește la nivel cromozomial în tulpini de *Klebsiella pneumoniae*. De fapt, prima genă de acest tip izolată la *Klebsiella spp.* a fost găsită la nivel de transpozon, ceea ce sugerează că acest element genetic mobil a jucat un rol important în evadarea genelor de la nivel cromozomial la nivel plasmidic (Pitton,1972).

Originea enzimelor TEM nu este cunoscută cu exactitate, însă ele se găsesc aproape întotdeauna codificate pe plasmide, excepție făcând TEM-12 și TEM-34, ale căror gene se găsesc pe cromozomi (Perilli ș.a.,1997).

În ceea ce privește origine genelor *bla_{CTX-M}* se consideră că acestea se desprind din genele cromozomiale de la *Kluyvera spp.*. Studiile filogenetice au demonstrat că genele *bla_{CTX-M-1}* se desprind din genele cromozomiale de la *K. cryocrescens*, genele *bla_{CTX-M-2}* din *K. ascorbata*, iar genele ce determină enzimele CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 se desprind din genele cromosomiale de la *K.georgiana* (Cantón ș.a.,2012). Se consideră că elemente genetice cum ar fi transpozonii ((Tn1, Tn2, Tn3, Tn21), integroni (clasa 1, 2), secvențele de inserție (ISEcp1, IS26, ISCR1) și chiar bacteriofagi au ajutat aceste gene să traverseze bariera determinată de genul bacterian și a favorizat transmiterea acestora în cross nu doar intraspecie ci și interspecie (Poirel ș.a., 2008). Deși mutațiile genetice sunt principalul motiv pentru numărul mare de variante alelice, se consideră că și recombinările genetice au jucat un rol important în transmiterea și originea acestor gene de rezistență (D'Andrea ș.a., 2013).

În funcție de frecvența cu care se izolează, ESBL au fost grupate în 2 grupuri: unul major reprezentat de enzimele ESBL izolate cel mai frecvent din cazurile clinice în cele mai multe părți ale lumii și a căror origine a fost descrisă anterior și un grup minor a cărui reprezentante au fost izolate sporadic.

Din grupul minor de ESBL-uri fac parte tipul OXA, PER, VEB, SFO, BES, BEL, TLA și tipul GES. Originea acestor enzime este în mod curent necunoscută și multe din ele fac parte din clasa moleculară A sau D. Pot fi codificate atât la nivel de cromozom cât și la nivel de plasmidă (Sridhar Rao, 2015). Cel mai frecvent tip de ESBL din grupul minor este OXA care a fost izolată inițial la tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, însă astăzi a fost identificată și la tulpinile de enterobacterii. Tipul OXA, este imediat urmat ca frecvență de izolare de tipurile VEB și PER raportate atât la tulpini de *Pseudomonas spp.* cât și la membrii familiei *Enterobacteriaceae* (Vahaboglu ș.a.,2001).

În ultimii 20 de ani, s-a înregistrat o creștere explozivă a numărului și tipurilor de enzime ESBL. În aceasta perioadă o singură enzimă minoră ESBL a fost transformată în majoră și câteva tipuri majore sunt pe punctul de a deveni minore. O atenție deosebită trebuie acordată efectelor cumulative ale presiunii selective exercitată de abuzul de antibiotice și rolului jucat de elementele genetice

mobile care au contribuit foarte mult la transmiterea, evoluția și răspândirea enzimelor ESBL cu rapiditate.

1.2. Clasificarea funcțională și moleculară a ESBL

În anul 1968 Saway și Mitshashi au realizat prima clasificare a beta-lactamazelor. Ulterior, au fost propuse și alte scheme de clasificare de către Jack și Richmond, Richmond și Sykes sau Sykes și Matthew (Saway ș.a.,1968; Jack ș.a.,1970). Clasificarea beta-lactamazelor de către aceștia s-a realizat pe baza proprietăților fiziologice ale acestor enzime cum ar fi inductibilitatea, acțiunea hidrolitică, profilul inhibitor, punctul izoelectric sau greutatea moleculară.

În prezent cele mai importante clasificări ale beta-lactamazelor sunt cele realizate de către Ambler și Bush. În 1980 Ambler a realizat o clasificare moleculară a beta-lactamazelor ce includea 2 clase: clasa moleculară A (serine beta-lactamazele) și clasa B (metalo-beta-lactamazele) (Ambler,1980). La această clasificare Jaurin și Grundstrom, în 1981 au mai adăugat clasa moleculară C (pentru enzimele AmpC), iar Huovinen P. și col. au adăugat în anul 1988 și clasa D (enzimele de tip OXA) (Jaurin ș.a.,1981; Huovinen,1988)

Pornind de la clasificarea lui Richmond și Sykes, în 1988 Bush K. propune o altă clasificare pe baza proprietăților fiziologice ale beta-lactamazelor (Bush, 1988). După o scurtă revizuire, în anul 1989 Bush K., Jacoby GA. și Medeiros AA. propun o clasificare funcțională bazată pe substratul și profilul inhibitor, clasificând astfel beta-lactamazele în 3 grupuri funcționale: 1, 2 și 3. În cadrul acestor grupuri, ei au clasificat enzimele pe baza diferențelor dintre acestea în mai multe subgrupuri (Bush ș.a.,1989; Bush ș.a.,1995).

Clasificarea funcțională realizată de către Bush și col. este în strânsă legătură cu clasificarea moleculară realizată de către Ambler. Astfel beta-lactamazele AmpC aparțin clasei moleculare C și grupului funcțional 1, metalo-beta-lactamazele clasei moleculare B și grupului funcțional 3, iar serine beta-lactamazele clasei moleculare A și grupului funcțional 2 ce cuprinde alte 11 subgrupuri. Conform clasificării realizate de Bush și Ambler, enzimele ESBL fac parte din clasa moleculară A, grupul funcțional 2be.

Clasificarea moleculară realizată de Ambler este una corectă, însă clasificarea funcțională a lui Bush este una cu implicații practice, deoarece gruparea enzimelor cu aceleași caracteristici funcționale în subgrupuri va permite clinicienilor să selecteze în cunoștiință de cauză antibioticele utilizate pentru terapie. Sistemul de clasificare propus de Bush este esențial pentru gruparea în același timp a enzimelor cu aceleași caracteristici și pentru stabilirea unei ordini în nomenclatura lor (Bush, 2013).

În tabelul 1.1. sunt sintetizate schematic informațiile cu privire la clasificarea funcțională și moleculară a beta-lactamazelor, substratul preferat și enzimele reprezentative pentru fiecare grup funcțional și clasă moleculară.

Tabelul 1.1. / Table 1.1.

**Clasificarea funcțională a beta-lactamazelor realizată de Bush,
Jacoby și Medeiros**
Functional classification of beta-lactamases by Bush, Jacoby and Medeiros

Grupul și subgrupul	Clasa moleculară (Ambler)	Antibioticele hidrolizate	Inhibate de		Enzimele reprezentative
			CA/TZ B	EDTA	
1	C	Cefalosporinele	-	-	MIR-1, ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinele	-	-	GC-1, CMY-37
2a	A	Penicilinele	+	-	PC1
2b	A	Penicilinele, cefalosporinele timpurii	+	-	TEM-1, TEM-2 SHV-1
2be	A	ESC, monobactami	+	-	TEM-3, SHV-2 CTX-M-15, K1, PER-1, VEB-1, (ESBL)
2br	A	Penicilinele	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	ESC, monobactami	-	-	TEM-50
2c	A	Carbapenemicele	+	-	PSE-1, CARB-3
2d	D	Cloxacilin	±	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	ESC	±	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemele	±	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	ESC	+	-	CepA
2f	A	Carbapenemele	±	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenemele	-	+	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
3b	B	Carbapenemele	-	+	CphA, Sfh-1

CA: acid clavulanic; TZB: tazobactam; ESC: cefalosporine cu spectru extins.

1.3. Modalități de transmitere a enzimelor ESBL

Transmiterea și răspândirea bolilor infecțioase determinate de bacterii multidrug rezistente, cum ar fi enterobacteriile producătoare de ESBL este un fenomen în creștere determinat de un complex de factori: turismul de agrement sau medical, repatrierea victimelor accidentate, transferul pacienților între unitățile sanitare, spitalizarea prelungită, abuzul de antibiotic, contactul direct sau indirect cu animalele.

Rezistența bacteriană la antibiotice poate fi intrinsecă, caracteristică unei anumite bacterii și depinzând de biologia acelui organism (de exemplu *E.coli* este rezistentă natural la vancomicină) sau poate fi dobândită. Rezistența dobândită apare ca urmare a achiziției de gene exogene prin intermediul plasmidelor (prin procesul de conjugare sau transformare), transpozonilor (conjugare), integronilor și bacteriofagilor (transducție) sau ca urmare a mutațiilor unor gene celulare sau printr-o combinație a acestor mecanisme (Raghunath,2008).

Transferul de gene de rezistență de la o bacterie la altă se numește transfer orizontal de gene. Principalele mecanisme ale acestui schimb de informație genetică sunt reprezentate de conjugare, transducție și transformare (Thenmozhi ș.a.,2014).

Astfel de mecanisme de transfer de gene permit mobilizarea unor fragmente specifice de ADN de la o regiune la alta, de la plasmide la plasmide, de la cromozom la cromozom sau între plasmide și cromozom (Vaidya, 2011).

Majoritatea enzimelor ESBL sunt determinate de gene ce se găsesc situate pe plasmide, transferul genetic realizându-se în principal prin fenomenul de conjugare (sexducție). Difuzia mediată de plasmide este de mare interes științific, mai ales că aceasta explică răspândirea acestor enzime în întreaga lume și cu o rapiditate notabilă (Navarro,2006).

Plasmidele sunt repliconi neesențiali ce sunt capabili să se replice independent de cromozom și se transmit în formă extracromozomială, fie pe verticală (de la o generație de indivizi la alta), fie pe orizontală (de la un individ la altul în cadrul aceleiași generații) (Jurcoane ș.a.,2006; Măciucă, 2014)

Plasmidele nu dețin gene esențiale pentru creșterea celulelor gazdă, însă prezintă mecanisme care le asigură replicarea autonomă, controlul numărului de replicări și asigură o moștenire stabilă în timpul diviziunii celulare. Ele pot determina transferul informației genetice lateral între bacteriile din diferite genuri sau familii prin procesul de conjugare. De asemenea aceste fragmente de ADN extracromozomial posedă sisteme de dependență, bazate în general pe factori de toxină-antitoxină, fiind capabile să omoare celulele fiice care nu moștenesc plasmida în timpul diviziunii celulare (Hayes,2003).

Plasmida R este cea care joacă un rol important în răspândirea genelor de rezistență, fiind un element genetic extracromozomial care conferă celulei bacteriene purtătoare rezistență la mai multe antibiotice (Händel ș.a., 2015).

Transferul acestei plasmide a fost observat și în medii naturale cum ar fi apa de mare sau în somonul crud, fără a exista o presiune selectivă impusă de administrarea unui antibiotic, specia de bacterii sau originea acestora (Kruse ș.a., 1994; Cottell ș.a., 2012)

Variabilitatea plasmidelor ce mediază transmiterea antibioretistenței la enterobacterii este mare, însă nu foarte mare. Există plasmide care sunt în mare parte predominante și plasmide care au fost asociate sporadic cu gene de rezistență specifice. Plasmidele IncFII, IncA/C, IncL/M și IncI1 au fost identificate ca fiind plasmidele cel mai des raportate în transmiterea genelor de rezistență ce determină enzimele ESBL. Acestea au fost identificate în mai multe țări și la bacterii cu origini și surse diferite. Conform literaturii de specialitate, apariția acestor tipuri de plasmide este strâns corelată cu presiunea selectivă determinată de administrarea antibioticelor, prevalența fiind crescută în cazul acestora comparativ cu populațiile de bacterii care nu au fost supuse acțiunii substanțelor antimicrobiene (Sherley ș.a., 2003; Johnson ș.a., 2007; Lindsey ș.a., 2009). Excepție de la această regulă, o reprezintă familia de plasmide IncFII, care este comună în mod natural în flora fecală atât la oameni cât și la animale, indiferent de gena de rezistență. Johnson și col. au detectat repliconul FII la plasmidele de la mai mult de 50% din tulpinile de *E.coli* provenite din flora fecală atât de la oameni sănătoși, ce nu au avut contact cu antibiotice cât și de la păsări sănătoase. Factori suplimentari sunt probabil responsabili pentru răspândirea și adaptarea la gazdă a plasmidelor IncFII (Johnson ș.a., 2007; Carattoli, 2009)

Analiza moleculară a unor tulpini bacteriene de *E.coli* producătoare de ESBL izolate de la păsări de curte și om a pus în evidență un procent mare de secvențe identice de plasmide, sugerând astfel transmiterea acestor gene de rezistență prin intermediul lanțului alimentar. Transferul tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL între ferme și om este rezultatul unui contact direct cu animalele sau al consumului de alimente contaminate (Levy ș.a., 1976).

O clasificare clară a plasmidelor este necesară deoarece oferă informații relevante cu privire la potențiala gazdă a unei gene de rezistență situată pe un anumit tip de plasmidă. De exemplu gena *bla*_{CTX-M-15} situată pe plasmida IncFII nu va difuza niciodată la alte specii bacteriene cum ar fi *Acinetobacter spp.* sau *Pseudomonas spp.* deoarece gazda acestei plasmide este reprezentată doar de enterobacterii (Poirel ș.a., 2005).

Un rol important în transmiterea informației genetice îl au și transpozoni denumiți și "gene săritoare". Aceștia sunt secvențe scurte de ADN ce pot migra între plasmide, între plasmide și cromozomul bacterian sau între o plasmidă și un bacteriofag (Henderson, 1999; Mărculescu ș.a., 2007).

Dacă plasmidele sunt capabile să se replice independent, transpozoni au nevoie de un replicon funcțional (plasmidă sau cromozom) pentru a se replica (Mărculescu ș.a., 2007).

Chiar dacă la bacteriile Gram negative transpozonul este non-conjugativ, dacă acesta face parte din ADN-ul unei plasmide conjugative, transferul orizontal este posibil. Dezvoltarea rapidă a rezistenței în cadrul unor populații bacteriene este susținută de transferul fie intracelular al transpozonilor între plasmide sau între cromozomii bacterieni și plasmide, fie de transferul intercelular al transpozonilor și plasmidelor conjugative (Mărculescu ș.a.,2007).

Integronii au fost identificați aproape exclusiv la bacteriile Gram negative și sunt definiți ca fiind secvențe de ADN ce conțin determinanți genetici ai unui sistem de recombinare cu specificitate de situs. Conțin două regiuni conservate și o regiune variabilă interpusă, aceasta din urmă fiind formată din casete de gene ce determină rezistența la antibiotice (Mărculescu ș.a.,2007).

Casetele de gene conțin o singură genă și un loc (site) de recombinare. Se cunosc peste 40 de casete și doar 5 dintre acestea nu conțin gene de rezistență (Agerso ș.a., 2005; Măciucă, 2014)

Integronii pot fi mobili, caracteristică determinată de localizarea cel mai frecvent pe plasmide sau transpozoni, însă au fost identificați și la nivelul ADN-ului cromozomial (Mărculescu ș.a.,2007).

Rolul integronilor din clasa 1 în transmiterea rezistenței la antibiotice este bine documentat (Briggs ș.a.,1999; White ș.a., 2003; Leverstein-van Hall ș.a.,2003). De asemenea, diversitatea genelor din caseta de gene purtate de clasa 1 de integroni a fost studiată și pentru tulpinile bacteriene de origine animală (Kadlec ș.a., 2008; Fluit ș.a., 2008;).

Genele *bla_{TEM}* ESBL sunt transportate și mobilizate de transpozonii Tn3 și Tn1, iar genele *bla_{SHV}* ESBL sunt diseminate de repliconi ce formează un compus transpozon defect (Poirel ș.a., 2008). În cazul transmiterii genelor *bla_{CTX-M}* ESBL, fenomenul este mai complex: diseminarea genelor *bla_{CTX-M-9}* , *bla_{CTX-M-2}* ,*bla_{CTX-M-1}* este favorizată de integronii din clasa 1, însă gena nu face parte dintr-o casetă de gene, în timp ce diseminarea genelor *bla_{CTX-M-15}* și *bla_{CTX-M-14}* se realizează în mod diferit (Su ș.a., 2008; Poirel ș.a.,2008).

În ceea ce privește bacteriile producătoare de ESBL izolate din mediu, în special în cazul celor expuse la detergenți sau reziduri de antibiotice, ori la tulpinile bacteriene producătoare de ESBL izolate din nămolul de epurare sau din dejecțiile animalelor, s-a demonstrat că diseminarea genelor ESBL între aceste tulpini se realizează tot prin intermediul clasei de integroni 1 (Joint working group of DARC and ARHAI, 2012).

Informații referitoare la transmiterea bacteriilor producătoare de ESBL între animale și mediul înconjurător sau alte animale sunt limitate. Există mai multe raportări privind prevalența și statul de rezervor ESBL al diferitelor specii de animale, însă originea sau dinamica transportului tulpinilor producătoare de ESBL la animale rămâne necunoscut. Tulpini producătoare de ESBL au fost izolate de la câini, păsări, cai, porci, bovine și iepuri (Carattoli, 2008; Coque, 2008a).

Rezistența la antibioticele beta-lactamice în populațiile bacteriene atât de origine umană cât și de origine animală este o problemă globală. Mecanismele de transmitere încrucișată a genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL, precum și elementele genetice mobile ce mediază transmiterea rezistenței intraspecie, interspecie, între om și animale sau în sens invers, reprezintă subiecte asidu cercetate și care implică încă multe necunoscute. Cunoașterea complexă a mecanismelor de apariție și transmitere a rezistenței la antibiotice este o condiție sine qua non pentru a reduce efectele pe termen lung ale acestui fenomen ce amenință sănătatea publică privită prin prisma conceptului “One health”.

1.4. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL asociate cu infecții umane

Bacterii producătoare de enzime ESBL au fost descoperite aproape pe toate continentele, chiar și în Antarctica (Hernández ș.a., 2012). La nivel global, se încearcă monitorizarea evoluției și distribuției tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL, în acest sens echipe naționale și internaționale desfășoară diferite studii cum ar fi: SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), EARSS-NET (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), etc.

Deși studiile au fost diferite ca perioadă de timp, ca zonă geografică analizată sau ca dimensiune a eșantioanelor studiate, toate au avut ca scop comun formarea unei imagini de ansamblu asupra prevalenței producătorilor de ESBL, speciile și genurile bacteriene ce sunt capabile să producă aceste enzime stabilirea mecanismului de apariție și a modului de transmitere, gradul de omologie genetică între tulpinile producătoare de ESBL, factorii de risc și modalități de limitare și combatere ale fenomenului de antibiorezistență determinat de enzimele ESBL.

Din momentul apariției și până în anul 2008-2009, enzimele ESBL apăreau cu predilecție mai mult în rândul tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* decât la tulpinile de *E.coli*. În anii ulteriori, prevalența a crescut semnificativ în rândul tulpinilor de *E.coli*, iar în multe zone geografice a depășit numărul tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* (Sridhar Rao, 2015).

Conform analizei retrospective asupra evoluției prevalenței enterobacteriilor producătoare de ESBL în funcție de zona geografică, realizată de către Sridhar Rao P.N. în anul 2015, în America de Nord (S.U.A. și Canada) prevalența tulpinilor de *E.coli* ESBL a fost cuprinsă în intervalul 2-4%. Începând cu anul 2007 prevalența acestor tulpini a crescut ajungând în anul 2012 la 18,4%. Pentru tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* în același areal geografic a fost raportată o prevalență variabilă între 4,9% și 7% până în anul 2004, iar din 2005

s-a înregistrat o creștere ajungând ca în anul 2012 prevalența să fie de 18,4% (Sridhar Rao, 2015).

În America Latină prevalența tulpinilor de *E.coli* și *K. pneumoniae* producătoare de ESBL este mai mare decât cea raportată în America de Nord. Până în anul 2004 prevalența tulpinilor de *E.coli* producătoare de ESBL a fost stabilă fiind de 10,3%, iar în anul 2008 a crescut până la 26,8% și în următorii 2 ani a scăzut ajungând în 2010 la 23,3%. Prevalența tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL, în perioada 1997-2000 a fost foarte crescută, raportându-se un procent de 45,8%. În anul 2002 a fost raportată o prevalență de 23% pentru aceeași specie. Deși în anul 2002 se observă aproape o înjumătățire a prevalenței, până în anul 2007 procentajul a crescut la 41,5%, iar în 2010 a ajuns la 52,4% (Sridhar Rao, 2015).

Prevalența generală a enterobacteriilor producătoare de ESBL este mai mare în Europa comparativ cu America de Nord. Dacă în țările scandinave prevalența tulpinilor producătoare de ESBL era cuprinsă în intervalul 2-4%, în blocul de est al Europei (Polonia, Bulgaria și Turcia) procentul enterobacteriilor producătoare de ESBL este foarte crescut ajungând la 40% (Coque, 2008; Brolund, 2014). Prevalența tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL a fost de 5,3% în 1997, iar în anul 2012 a crescut la 19,6%. Pentru tulpinile de *Klebsiella pneumoniae*, în zona menționată anterior, prevalența a fost de 22,7% până în anul 1996, a înregistrat o serie de fluctuații în perioada 1996-2011, iar în anul 2012 s-a raportat un procent de 32,2 (Sridhar Rao, 2015).

În zona Asia-Pacific au fost semnalate prevalențe diferite pentru tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL în funcție de regiune. Prevalența tulpinilor de *E. coli* ESBL a fost de 9% în anul 1999 ajungând în anul 2013 la un procentaj de 48%. Pentru tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* în anul 1999 prevalența a fost aproape dublă față de cea a tulpinilor *E.coli* ESBL, a crescut în următorii ani ajungând în anul 2013 la 47%. În Australia și Noua Zeelandă prevalența diferă față de zonele menționate anterior, fiind mult mai mică: 12% pentru tulpinile de *E.coli* în anul 2012 și 15% pentru *Klebsiella pneumoniae* în același an. De asemenea nu au fost înregistrate fluctuații importante în perioada 1999-2013 (Sridhar Rao, 2015).

În Orientul Mijlociu și Africa informații privind prevalența tulpinilor producătoare de ESBL apar începând cu anul 2003. Conform studiului retrospectiv publicat de Sridhar Rao în anul 2015, prevalența tulpinilor de *E.coli* producătoare de ESBL în regiunea amintită anterior este cuprinsă între 13% în anul 2003 și 18,4% în 2012. În aceeași regiune prevalența tulpinilor de *K. pneumoniae* raportată este cuprinsă în intervalul 18% în anul 2003 și 12,7% în anul 2012, maxima înregistrându-se în anul 2007 când a fost comunicată o prevalență de 37,6%.

În India nu există un program național care să monitorizeze evoluția purtătorilor și a bacteriilor producătoare de enzime β -lactamaze cu spectru extins. Date cu privire la aceste aspecte au fost menționate doar ca urmare a unor programe internaționale de supraveghere a evoluției antibiotezistenței. Prevalența tulpinilor de *E.coli* și *K. pneumoniae* producătoare de ESBL raportată pentru această zonă prezintă fluctuații în funcție de zona analizată, eșantionul studiului și de autori. Walsh TR. în cadrul programului MYSTIC comunică o prevalență de 92% pentru *E. coli* producătoare de ESBL și 96% pentru *K. pneumoniae* producătoare de ESBL (Walsh ș.a., 2007). Hawser SP. publică pentru anul 2007 în programul SMART o prevalență de 79% pentru tulpinile de *E.coli* și 69,4% pentru *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL (Hawser ș.a., 2009).

În perioada 2013-2014, prevalența tulpinilor de *E.coli* și *K. pneumoniae* producătoare de ESBL variază în funcție de zona geografică, astfel:

- în nordul Indiei a fost semnalată o prevalență ce variază între 24-90% pentru *E.coli* și între 9-80% pentru *K. pneumoniae* (Rawat ș.a., 2013; Chaudhary ș.a., 2014).
- În partea de est a Indiei a fost raportată o prevalență variabilă între 12-89% pentru *E.coli* prducătoare de ESBL și 26-93% pentru *K. pneumoniae* producătoare de ESBL (Dutta ș.a., 2013; Singh ș.a., 2014).
- în centrul Indiei, prevalența enterobacteriilor producătoare de enzime beta-lactamaze cu spectru extins este aproape la jumătate față de nordul și estul acestui areal geografic: 41-50% pentru *E.coli* și 26-48% pentru *K. pneumoniae* producătoare de ESBL (Shashwati ș.a., 2014; Bajpai ș.a., 2014).
- În zona de vest a fost raporată cea mai scăzută prevalență de pe întreg teritoriul Indiei, existând variații pentru fenotipurile ESBL între 20-26% pentru *E.coli* și 15-67% pentru *K. pneumoniae* (Sood,2013; Patel ș.a.,2014; Chandra ș.a.,2014;).

Fluctuațiile destul de mari ale prevalenței producătorilor ESBL pe teritoriul Indiei apar ca urmare a mărimii eșantionului analizat, a tipurilor de pacienți, a diferitelor zone de izolare și nu în ultimul rând ca urmare a metodologiei de detecție. Prin urmare, analizând variabilele menționate anterior, deși există o cantitate mare de date, este dificil de realizat o interpretare semnificativă a prevalenței bacteriilor producătoare de ESBL.

Stabilirea prevalenței tulpinilor producătoare de ESBL este importantă, însă pentru a ține sub control diseminarea și răspândirea producătorilor ESBL este mai important să se identifice potențialele surse, căile de transmitere și identificarea genelor de rezistență ce codifică aceste enzime și implicit stabilirea genotipului ESBL.

Există o variație considerabilă a distribuției genotipurilor ESBL în funcție de regiunea geografică.

În America de Nord (Canada și S.U.A.) genotipul ESBL determinat de genele *bla_{CTX-M-14}* și *bla_{CTX-M-15}* sunt predominante la membrii familiei . Alte genotipuri din categoria CTX-M izolate în această regiune geografică au fost determinate de genele *bla_{CTX-M-2}* , *bla_{CTX-M-3}* , *bla_{CTX-M-27}* , *bla_{CTX-M-9}* și *bla_{CTX-M-24}*, ultimele două fiind raportate doar în Canada. Din categoria SHV au fost identificate genotipurile determinate de genele *bla_{SHV-2}* și *bla_{SHV-12}*, atât în Canada cât și în SUA, în plus în SUA au fost raportate și genele *bla_{SHV-7}* și *bla_{SHV-5}*. Genele *bla_{TEM-10}* și *bla_{TEM-12}* au fost semnalate frecvent în SUA, urmate cu o frecvență mai redusă de izolare de *bla_{TEM-26}* și *bla_{TEM-155}*, iar în Canada *bla_{TEM-11}*, *bla_{TEM-12}* și *bla_{TEM-52}* sunt genele cel mai frecvent raportate pentru categoria TEM ESBL (Lewis ș.a.,2007; Peirano ș.a., 2012; Wang ș.a., 2013;).

În America latină genotipul ESBL cel mai frecvent izolat este dominat de grupul CTX-M, fiind identificate următoarele gene: *bla_{CTX-M-2}* în Argentina, Brazilia, Peru și Bolivia, *bla_{CTX-M-8}* în Brazilia și de asemenea Bolivia, *bla_{CTX-M-14}* în Peru și Bolivia, *bla_{CTX-M-15}* predominant în Mexic dar izolat și din Brazilia, Peru și Bolivia. Tot din grupul major de ESBL-uri a fost raportată și prezența genelor *bla_{SHV-2}* și *bla_{SHV-5}*. Spre deosebire de America de Nord, în America latină a fost semnalată și prezența genotipurilor determinate de genele *bla_{PER2}* (Argentina) și *bla_{TLA-1}* (Mexico), care fac parte din grupul minor de ESBL-uri și care sunt izolate cu o frecvență mult mai redusă (Peirano ș.a.,2011; Silvia-Sanchez ș.a, 2011; Sennati ș.a., 2012;).

În Europa au fost raportate genotipuri aparținând grupurilor TEM, SHV și CTX-M, astfel:

- din grupul TEM au fost identificate genele: *bla_{TEM-3}* , *bla_{TEM-5}* , *bla_{TEM-7}*, *bla_{TEM-15}* , *bla_{TEM-24}*, *bla_{TEM-26}* , *bla_{TEM47}*, *bla_{TEM-52}*;
- din grupul SHV au fost semnalate în mai multe părți ale Europei genele *bla_{SHV-2}*, *bla_{SHV-3}*, *bla_{SHV-5}*, *bla_{SHV-12}*;
- din grupul CTX-M gena cea mai frecvent raportată, aproape din fiecare zonă a Europei este *bla_{CTX-M-15}*. În țările scandinave au fost identificate genele *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}* și *bla_{CTX-M-9}*. În partea de est a Europei, în țări precum Rusia și Polonia sunt endemice genele *bla_{CTX-M-1}* și *bla_{CTX-M-3}*. În partea de vest (Spania, Portugalia) au fost identificate ca fiind endemice genele *bla_{CTX-M-9}* și *bla_{CTX-M-14}*. În Anglia au fost identificate 9 tipuri diferite de enzime CTX-M. În țări precum Italia, Belgia, Franța a fost raportată enzima CTX-M-2, iar CTX-M-32 a fost identificată din țări ca Spania, Italia, Portugalia și Anglia (Livermore ș.a.,2007; Coque ș.a., 2008; Cantón ș.a.,2008.)

Pe continentul Asiatic, au fost izolate ca și în Europa, genotipuri aparținând grupului major de ESBL-uri:

- în China cele mai frecvent raportate gene din cadrul grupului CTX-M sunt: *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-11}*, *bla_{CTX-M-15}* și *bla_{CTX-M-9}*, iar cu o frecvență mult mai redusă au fost identificate genele *bla_{CTX-M-22}*, *bla_{CTX-M-24}*, *bla_{CTX-M-27}*, *bla_{CTX-M-55}* și *bla_{CTX-M-79}*. Din grupul SHV predominante sunt genele *bla_{SHV-2}*, *bla_{SHV-5}* și *bla_{SHV-13}* (Xia ș.a.,2014; Zhao ș.a.,2014).

- în Japonia, din grupul CTX-M predomină enzimele ESBL CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-1, CTX-M-15 și CTX-M-14, însă au fost izolate și enzimele CTX-M-8, CTX-M-27, CTX-M-3 sau CTX-M-25. Grupurile TEM și SHV au fost izolate mai rar, dintre acestea literatura de specialitate menționând identificarea genelor *bla_{TEM-28}* și *bla_{SHV-2}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-24}* și *bla_{SHV-27}* (Yano ș.a.,2013; Matsumura ș.a.,2013).

- în Coreea de sud a fost izolat cu o frecvență crescută gena *bla_{CTX-M-14}* urmată apoi ca frecvență de *bla_{CTX-M-15}*. Sporadic au fost identificate și genele *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-27}*, *bla_{CTX-M-57}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{CTX-M-12}*, *bla_{CTX-M-22}* și *bla_{CTX-M-24}*. Din grupurile SHV și TEM au fost izolate enzimele SHV-2, SHV-2a și TEM-52 (Kang ș.a.,2013; Kim ș.a.,2014).

- în restul țărilor din sudul Asiei au fost raportate frecvent genele *bla_{CTX-M14}*, *bla_{CTX-M15}*, *bla_{CTX-M3}*. Sporadic au fost izolate enzime de tip ESBL cum ar fi CTX-M-9, CTX-M-22, CTX-M-24, CTX-M-27 și CTX-M-55. De asemenea și genele *bla_{SHV-2}*, *bla_{SHV-2a}*, *bla_{SHV-5}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-27}* se regăsesc în literatura de specialitate pentru această zonă a continentului Asiatic. Din grupul minor de ESBL-uri a fost izolată enzima VEB-1 în Tailanda și Vietnam (Hawkey, 2008).

- în Australia gena ESBL dominantă este *bla_{CTX-M-1}*, urmată apoi de *bla_{CTX-M-15}*. Cu o frecvență mai rară au fost izolate și genele *bla_{CTX-M-3}* sau *bla_{CTX-M-14}*. Din grupul enzimelor ESBL de tipul SHV cel mai frecvent genotip este determinat de gena *bla_{SHV12}* (Hawkey,2008).

În India au fost raportate genotipuri ESBL aparținând grupurilor CTX-M predominant și SHV, astfel literatura de specialitate menționează prezența genelor *bla_{CTX-M-15}* frecvent, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-28}* și *bla_{SHV-5}* (Revathi ș.a.,1998; Karim ș.a.,2001; Ensor ș.a.,2006; Kingsley ș.a., 2008; Jemima ș.a.,2008).

O prezentare schematică a informațiilor prezentate anterior cu privire la distribuția globală a genotipurilor ESBL a fost realizată în figura 1.2.

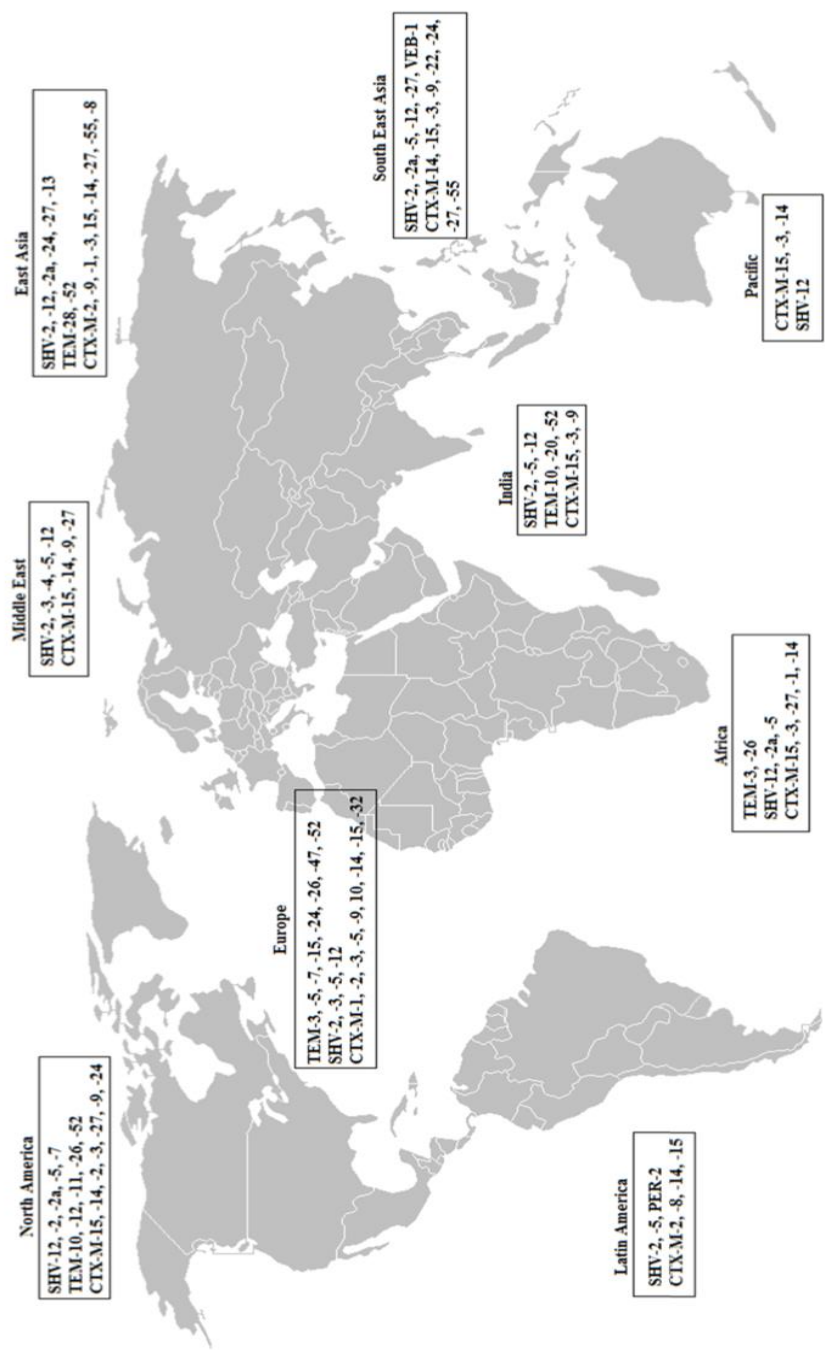


Fig.1.2. Distribuția globală a diferitelor genotipuri ESBL de origine umană
Fig.1.2. The global distribution of different ESBL genotypes of human origin
(Sridhar Rao, 2015)

1.5. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL la animale

Emergența și răspândirea enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins la membrii familiei *Enterobacteriaceae* ce provin de la animalele de rentă, animalele de companie și păsările migratoare este o problemă majoră și de interes mai ales prin prisma impactului asupra sănătății publice. În acest sens există numeroase articole ce conțin informații cu privire la prevalența tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la animale, din diferite țări, însă o atenție deosebită s-a acordat mai ales stabilirii genotipului implicat, încadrarea în grupul clonal și stabilirea unor omologii genetice între tulpinile de origine animală și cele de origine umană. Studiile realizate în domeniul veterinar au avut ca scop final nu neapărat stabilirea unei prevalențe, ci demonstrarea riscului de transmitere orizontală a genelor de rezistență între tulpinile de origine umană și cele de origine animală și calitatea de rezervor pe care o pot avea animalele de companie, de rentă și păsările migratoare în diseminarea acestor markeri de rezistență antimicrobiană.

În America de Nord au fost izolate de la vaci, păsări, câini și cai genotipuri ESBL care fac parte din grupurile CTX-M, SHV, TEM și CMY-2. Cele mai frecvente gene identificate au fost *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-1} și *bla*_{SHV-12} (Frye ș.a.,2003; O'Keefe ș.a., 2010; Shaheen ș.a., 2011).

În America Latină, de la animale de companie, bivoli și de la papagali au fost identificate genotipuri ESBL determinate de genele *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-2} și *bla*_{PER-2} (Moreno ș.a.,2008; Barbato ș.a., 2012).

În Europa, predomină genele *bla*_{CTX-M}, dintre acestea fiind raportate genele *bla*_{CTX-M1} (predominant), *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-13}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-24}, *bla*_{CTX-M-28} și *bla*_{CTX-M-32}. Din categoria SHV, gena cea mai frecvent identificată este *bla*_{SHV-12}, urmat apoi de *bla*_{SHV-2} și *bla*_{SHV-5}. Enzimele ESBL din grupul TEM cel mai des întâlnite la tulpinile bacteriene izolate de la animale sunt TEM-52, urmate apoi de TEM-106 și TEM-116 (Coque ș.a., 2008a).

În Spania grupul genetic CTX-M-9 a fost izolat și de la animale dar și de la om (Rodriquez-Bano ș.a.,2006). În Marea Britanie genele dominante izolate de la vaci, oi, cai, porci și animale de companie sunt *bla*_{CTX-M-14} și *bla*_{CTX-M-15}. Sporadic au fost raportate și genele *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-20}, *bla*_{CTX-M-32}. De asemeni tot în Marea Britanie a fost demonstrat că tulpinile bacteriene caracterizate genotipic ca fiind purtătoare a genei *bla*_{CTX-M-15} aparțin grupului clonal pandemic ST131, serotip O25, același grup clonal din care fac parte și tulpinile bacteriene ESBL ce au determinat infecții la om (Platell JL. et al., 2011). În Elveția, tulpinile de implicate în episoadele de infecții urinare la animale

de companie au fost confirmate genetic ca fiind purtătoare a genei *bla_{CTX-M-15}*, însă spre deosebire de tulpinile producătoare de ESBL din Anglia, acestea fac parte din grupul clonal ST533 (Huber ș.a., 2013).

Pe continentul Asiatic, din fecalele câinilor au fost izolate genele *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{CTX-M-27}*, ultima aparținând grupului clonal pandemic ST131, serotipul O25 (Ma ș.a.,2009). De asemeni au fost raportate și subgrupurile CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-55 (Harada ș.a., 2012). În Coreea din fecalele câinilor comunitari au fost izolate tulpini bacteriene producătoare de ESBL ce sunt caracterizate genetic prin prezența genelor *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-24}*, *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-55}*, *bla_{CTX-M-27}* și *bla_{CTX-M-65}* (Tamang ș.a.,2012).

În Africa de la animale de companie au fost identificate genele *bla_{CTX-M15}* și *bla_{CTX-M-1}*. De asemenea gena *bla_{CTX-M-15}* aparține grupului clonal pandemic ST131, serotipul O25. În Australia a fost raportată și gena *bla_{SHV-12}* (Sidjabat ș.a.,2007; Albrechtova ș.a.,2012; Sallem ș.a., 2013).

În India, au fost semnalate prezența grupului CTX-M-1 și TEM la tulpini producătoare de ESBL izolate de la porci (Lalzampaia ș.a., 2013).

Tabelul 1.2. redă o sinteză a genotipurile comune izolate de la animale și om în funcție de regiunile analizate anterior.

Tabelul 1.2. / Table 1.2.

Genotipuri ESBL izolate atât de la om cât și de la animale la nivel mondial
ESBL genotypes isolated from both humans and animals worldwide

Regiunea	Genotip ESBL izolat de la om dar și de la animale
America de Nord	CTX-M-14;CTX-M-15; SHV-12
America latină	CTX-M-8; CTX-M-15; PER-2
Europa	CTX-M-1; CTX-M-2; CTX-M-3; CTX-M-9; CTXM-14; CTX-M-15; CTX-M-32; SHV-2; SHV-5; SHV-12; TEM-52;
Asia	CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-9; CTX-M-14; CTX-M-15; CTX-M-24; CTX-M-27; CTX-M-55;
Africa	CTX-M-1; CTX-M-15; SHV-12.

1.6. Răspândirea și distribuția tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL în România

În ceea ce privește situația în România, majoritatea studiilor care au analizat rezistența la antibiotice a germenilor din familia *Enterobacteriaceae* s-au efectuat pe tulpini provenite din spitalele umane și se limitează în mare parte la testarea antibio rezistenței prin metoda clasică, difuzimetrică și raportarea nivelului de rezistență obținut.

În anul 2009 a fost inițiat un studiu de screening epidemiologic ce s-a realizat în spitale de boli infecțioase din patru centre universitare din România. În urma acestui studiu, a fost analizată comparativ pentru două perioade de șase luni (iulie 2008-iunie 2009) și cu datele retrospective ale anului 2007, rezistența germenilor izolați din urocultură. Din totalul de tulpini studiate și testate în cadrul proiectului MAR-T 11,1% din tulpinile de *E. coli* au fost producătoare de ESBL și în proporție de 39,2% tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* au fost producătoare de ESBL. De asemenea s-a observat sensibilitate în creștere la piperacilină-tazobactam pentru tulpinile de *E.coli* (www.mateibals.ro).

Tuchiluş M. și col. în anul 2011 într-un studiu efectuat pe tulpini de *E.coli* și *K. pneumonia* izolate de la pacienți umani internați la Spitalul Universitar Sf. Spiridon din Iași au identificat grupul CTX-M-1 ca fiind dominant pentru tulpinile atât de *E.coli* cât și de *K.pneumoniae* producătoare de ESBL. De asemenea a fost pentru prima data raportată în România prezența unei tulpini de *E.coli* producătoare de ESBL din grupul CTX-M-9. Tulpinile testate au prezentat un nivel ridicat de rezistență la cefalosporine, cu valori ale concentrației minime inhibitorii la cefotaxim de 4 ori mai mari decât valorile CMI la ceftazidim (Tuchiluş ș.a., 2011).

În anul 2012, Licker M. și col. într-un studiu efectuat în două spitale din Timișoara în perioada ianuarie-martie 2010 au stabilit rate ridicate de prevalență pentru tulpini din familia *Enterobacteriaceae* producătoare de ESBL. Astfel din totalul de tulpini analizate, 37,32% au fost producătoare de ESBL. Conform acestui studiu, comparând datele obținute de la aceleași centre în perioada 2005 s-a constatat o creștere a tulpinilor de *E.coli* producătoare de ESBL de la 23,91% la 29,78%, în timp ce procentajul pentru tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL sunt în scădere de la 63% la 56,86% (Licker ș.a., 2012).

Miftode E. și col. au raportat în 2012 prezența genelor *bla*_{CTX-M-15} și *bla*_{CTX-M-9} la tulpini de *E.coli* de origine umană producătoare de ESBL (Miftode ș.a., 2012).

Dorobăț O. M. și col. în analiza retrospectivă asupra tulpinilor de *E.coli* și *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL au concluzionat că rezistența la cefalosporine din generația a treia a genurilor enunțate mai sus este în continuă creștere și prin urmare și incidența ESBL. Astfel s-a înregistrat o creștere de la

11,3% în 2009 pentru *E.coli* la 17,2% în anul 2013, respectiv de la 37,2% în anul 2009 pentru *K. pneumoniae* la 47% în anul 2013 (Dorobăț ș.a.,2013)

În anul 2015 Hristea A. și col. au izolat din infecții ale sângelui tulpini de *E.coli* și *K. pneumoniae* purtătoare ale genei *bla_{CTX-M-15}*, mai mult tulpinile de *E.coli* producătoare de ESBL aparțineau grupului clonal ST131 (Hristea ș.a.,2015).

În ceea ce privește emergența tulpinilor de origine animală producătoare de ESBL în România, studiile realizate sunt puține și limitate din punct de vedere a zonei geografice și al consistenței loturilor analizate.

Într-un studiu realizat în 2015, Cozma și col. au constatat o prevalență de 25,86% a purtătorilor de enterobacterii producătoare de ESBL în rândul unei populații de câini comunitari din Iași. Faptul că probele au provenit de la animale ce nu au fost tratate cu antibiotice arată că circulația liberă a câinilor fără stăpân, deșeurile alimentare lăsate la voia întâmplării, condițiile precare de igienă sunt factori majori care contribuie la transmiterea in-cross a genelor de rezistență în circuitul animal-mediul animal-om (Cozma ș.a., 2015).

Cozma și col. într-un studiu preliminar realizat în populația animalelor de companie (câini și pisici) clinic sănătoase și care prezentau un istoric în tratamentul cu antibiotice, a evidențiat o prevalență de 62,06% a purtătorilor de tulpini de *E.coli* și *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL (Cozma ș.a.,2015).

Măciucă I.E. a realizat un studiu amplu care abordează tema tulpinilor de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins izolate de la puii broiler și personalul lucrător în abator, oferind indicii despre cât de comun este portajul *Enterobacteriaceae* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins în efectivele de pui și personalul lucrător în abator. Pentru izolatele de la pui, Măciucă I.E. a constatat prezența genelor *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* (cea mai mare prevalență a fost pentru *bla_{SHV-12}*), *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-14}*. Tulpinile ESBL izolate de la oameni au fost caracterizate molecular prin prezența genelor *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* (*bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-108}*), *bla_{CTX-M}* (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-15}*). Izolatele umane purtătoare a genelor, *bla_{CTX-M-15}* aparțin grupului clonal ST131-O25, această linie genetică fiind responsabilă pentru diseminarea genelor, *bla_{CTX-M-15}* la nivel global (Măciucă,2014; Măciucă ș.a.,2015).

Apariția și răspândirea la nivel global a genelor *bla_{CTX-M}* este principalul factor care influențează rezistența la cefalosporine a tulpinilor de *E.coli* și *Salmonella spp.* izolate de la animale de companie și de rentă. Identificarea genei *bla_{CTX-M-15}* la tulpinile de atât de origine umană cât și de origine animală ca aparținând grupului clonal pandemic ST131, serotipul O25 este o preocupare a lumii științifice la nivel global. Utilizarea profilactică a cefalosporinelor la animalele de rentă pentru a preveni infecțiile bacteriene este considerată unul din factorii

principali și importanți în selectarea și răspândirea bacteriilor producătoare de ESBL. Deoarece produsele alimentare de origine animală și animalele de companie pot constitui o sursă importantă pentru difuzarea genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL la om, rapoartele de date epidemiologice cu privire la rezistența antimicrobiană la animale sunt instrumente importante și necesare pentru a fi utilizate în managementul clinic al bolilor infecțioase, dar și pentru a ține sub control și a preveni difuzarea tulpinilor producătoare de ESBL (Santos ș.a., 2013)

1.7. Rezistența tulpinilor bacteriene la acțiunea fluorochinolonei

În ultimele două-trei decenii rezistența la chinolone și fluorochinolone este din ce în ce mai des raportată, atât pentru izolatele de uz uman cât și pentru cele de origine animală, aceasta fiind o consecință a administrării pe scară largă a acestor antibiotice în tratamentul bolilor infecțioase bacteriene (Guillard ș.a., 2010).

Rezistența determinată de enzimele beta-lactamaze cu spectru extins este frecvent asociată cu rezistența la alte clase de antibiotice, fenomenul de rezistență in-cross și "*multidrug resistance*" fiind des raportat pentru tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL. La animalele de companie, la fel ca și la om tratamentul de prima intenție în cazul infecțiilor clinice este realizat cu antibiotice din clasa beta-lactamine și fluorochinolone, ceea ce a dus în timp la creșterea numărului de tulpini multirezistente. Mai mult decât atât, administrarea în ferme a fluorochinolonei a dus la exercitarea unei presiuni selective asupra bacteriilor multirezistente (Ewers ș.a., 2012; Rzewuska ș.a., 2015).

În prezent sunt cunoscute trei mecanisme de rezistență la acțiunea fluorochinolonei: mutațiile care modifică la nivelul celulei bacteriene receptorii specifici pentru fluorochinolone (ADN giraza pentru bacteriile Gram negative și ADN topoizomeraza pentru bacteriile Gram pozitive), mutații ce reduc acumularea antibioticului la nivel periplasmatic și rezistența mediată plasmidic care protejează celula bacteriană de efectul fluorochinolonei (Drlica ș.a., 1997; Jacoby, 2005).

Puține bacterii sunt capabile să funcționeze doar cu ADN giraza, majoritatea bacteriilor având ambele enzime. La bacteriile Gram negative, ADN giraza este principala țintă pentru inhibarea de către chinolone, topoizomeraza IV fiind mai puțin sensibilă (Jacoby, 2005).

Unul din mecanismele intens studiate este rezistența la fluoroquinolone mediată plasmidic. Aceasta a fost raportată pentru prima dată la un izolat de *Klebsiella pneumoniae* fiind determinată de prezența genei *bla_{qnr}* (Martínez-Martínez ș.a., 1998; Redgrave L.S. ș.a., 2014). Analiza structurală recentă a unei proteine qnr a indicat că rezistența la fluorochinolone prin acest mecanism are la

bază legarea proteinei qnr de topoizomerază și astfel este împiedicată practic interacțiunea antibioticului cu enzima specifică (Xiong ș.a.,2011).

Existența mai multor gene alele *bla_{qnr}* au determinat în prezent existența mai multor familii de gene *bla_{qnr}* mediate plasmidic (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* și *qnrD*) care protejează ADN giraza sau topoizomeraza IV de acțiunea chinolonelor (Jacoby ș.a., 2008; Redgrave ș.a., 2014).

O altă enzimă răspândită pe scară largă și implicată în mecanismul de rezistență mediată plasmidic la fluoroquinolone este AAC-(6')-Ib-cr. Aceasta este determinată de gena *bla_{aac-(6')-Ib-cr}*, o variantă a genei *bla_{aac(6')-Ib}* și este responsabilă cu reducerea gradului de sensibilitate a tulpinilor bacteriene purtătoare la Ciprofloxacin sau Norfloxacin (Park ș.a.,2006; Vetting ș.a., 2008).

Recent, a fost descris un alt mecanism de rezistență la acțiune fluoroquinolonelor, prezența pompelor de eflux care sunt mediate plasmidic și caracterizate molecular prin prezența genei *bla_{QepA}*.

Determinanții rezistenței mediate plasmidic la fluoroquinolone joacă un rol important în rezistența la alte antibiotice, în special antibioticele beta-lactamice.

Un număr mare de studii au arătat că plasmidele pe care se găsesc genele *bla_{qnr}* se găsesc de asemenea și determinanții ce codifică enzimele beta-lactamază cu spectru extins (Eftekhari ș.a.,2015).

1.8. Implicațiile asupra sănătății publice

Terapia cu antibiotice în medicina veterinară are mai multe implicații. Antibioticele din clasa beta-lactamine sunt unele dintre cele mai utilizate antimicrobiene în medicina veterinară fie în scop curativ, fie în scop profilactic. Enzimele beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) sunt mecanismul de rezistență cel mai important atât din punct de vedere clinic, cât și din punct de vedere economic, deoarece acestea hidrolizează și inactivează antibioticele beta-lactamice, atât de uzitate și în medicina veterinară dar și în medicina umană. Din considerente genetice, prezența acestor enzime la diferite tulpini bacteriene este asociată cu rezistența și la alte clase de antibiotice non-beta-lactamice cum ar fi fluoroquinolone, aminoglicozide și trimetoprim-sulfametoxazol. În condițiile menționate anterior, tratamentul în cazul infecțiilor cauzate de bacterii purtătoare de enzime ESBL este limitat (Nóbrega ș.a.,2014).

Rezistența la antibiotice este o amenințare în curs de dezvoltare atât în medicina umană cât și în medicina veterinară și constituie în special o problemă în cazul infecțiilor produse de bacterii zoonotice.

În ultimul deceniu, ca urmare a creșterii rapide și la scară largă a emergenței infecțiilor cauzate de bacterii producătoare de ESBL, atenția a fost îndreptată către stabilirea unor corelații între enzimele ESBL de origine umană și cele de origine animală, presupunându-se că animalele de rentă, animalele de companie și păsările migratoare ar putea constitui un potențial rezervor pentru

difuzarea și menținerea genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL. În zilele noastre, există o coabitare strânsă între animale și om, iar utilizarea acelorași efectori antimicrobieni atât în terapia bolilor infecțioase în medicina umană cât și în medicina veterinară, precum și prezența acestor gene pe elemente genetice foarte mobile ce le asigură transferul cu ușurință nu doar intraspecie cât și interspecie, constituie argumente importante pentru susținerea și răspândirea cu rapiditate și lejeritate a acestor enzime. În plus, mai multe bacterii Gram-negative, ce au impact clinic și economic în medicina veterinară pot provoca infecții la om (Nóbrega ș.a.,2014).

Un alt factor important ce a stat la baza creșterii și răspândirii bacteriilor producătoare de ESBL în medicina veterinară a fost lipsa de biosecuritate în industria creșterii animalelor din țările subdezvoltate.

Preocuparea crescândă cu privire la evoluția antibioretistenței în medicina veterinară a fost responsabilă pentru creșterea exponențială din ultimii ani a numărului de publicații ce se referă la bacteriile producătoare de ESBL izolate de la animale. Au fost izolate tulpini bacteriene producătoare de ESBL din mastita bovină (Locatelli C. et al., 2010), produse din carne (Sunde ș.a.,2009), fecale și ficatul puilor de carne (Bortolaia ș.a.,2010), cai (Damborg ș.a., 2012), porcine (Zou ș.a.,2011), viței de lapte, vaci și produse lactate (Wittum ș.a.,2010; Watson ș.a., 2011).

La animalele sălbatice, bacterii producătoare de ESBL au fost izolate din materiile fecale ale păsărilor de pradă (Pinto ș.a., 2010), ale șobolanilor maro (*Rattus norvegicus*) (Guenther ș.a., 2010) și din fecalele pescărușilor (Poeta ș.a., 2008).

În ceea ce privește animalele de companie, bacterii producătoare de ESBL au fost izolate din tractul urinar al câinelui și pisicii (O'Keefe ș.a.,2010), la nivelul rănilor și prepuțului (Steen ș.a.,2007), din cazuri de cholangio-hepatită la câini (Timofte ș.a.,2011) și din materiile fecale ale câinilor (Wedley ș.a.,2011).

Animalele de companie pot juca un rol important în transmiterea bacteriilor producătoare de ESBL putând fi considerate un adevărat rezervor de gene de rezistență ca urmare a tratamentului cu antibiotice și a coabitării strânse cu oamenii (Guardabassi ș.a., 2004). De asemenea, proprietarii pe de altă parte pot fi considerați la rândul lor sursă de agenți patogeni pentru animalele lor, așa cum se întâmplă de exemplu în cazul *Staphylococcus aureus* metilicilino rezistent, Rutland B.E. și col. susținând posibilitatea schimbului de gene de rezistență interspecie (Rutland ș.a.,2009).

Tulpinile bacteriene de *E.coli* genotipul ESBL CTX-M-15 aparținând grupului clonal pandemic ST131, serogrupul O25 sunt asociate cu infecțiile umane dificil de tratat din cauza multidrug rezistenței. Determinarea prevalenței la animale a tulpinilor bacteriene care fac parte din acest grup clonal este importantă atât pentru medicina veterinară, cât și pentru medicina umană. Astfel, în anul

2010, Ewers și col. au constatat că 5,6% din tulpinile de *E.coli* producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie din 8 țări europene au aparținut acestui grup clonal ST131, serogrupul O25, grup considerat pandemic (Ewers ș.a.,2010).

În anul 2014, în Marea Britanie a fost raportată prima detectare a unor tulpini de enterobacterii izolate din cazuri clinice de la animale de companie aparținând genotipului CTX-M-15 și grupului clonal pandemic amintit anterior, ST131-O25. Mai mult decât atât, tot de la animale de companie, în același studiu a fost semnalată pentru prima dată prezența tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL caracterizate molecular prin prezența genei *bla*_{CTX-M-27}, aparținând aceluiași grup clonal ST131:O25 (Timofte ș.a., 2014). Omologia genetică existentă între tulpinile bacteriene producătoare de ESBL purtătoare ale genei *bla*_{CTX-M-15}, linia genetică ST131-O25, izolate de la animalele de companie și om în Marea Britanie, ar putea sugera o posibilă transmitere interspecie și implicațiile pe care le ar putea avea asupra sănătății publice (Timofte ș.a.,2014). Constatările realizate de către Timofte și col., redate anterior, subliniază nevoia de supraveghere a rezistenței antimicrobiene la animalele de companie în vederea stabilirii rolului pe care acestea îl joacă în răspândirea rezistenței la antibiotice.

Utilizarea antimicrobienelor profilactic în fermele de animale poate influența sănătatea publică prin potențialele efecte asupra omului, în acest sens existând numeroase cercetări ce au pus în evidență transferul de gene de rezistență interspecie (Karp ș.a.,2004; Van Loo ș.a.,2007). Studii realizate pe acest segment de cercetare au semnalat prezența unor casete de gene similare la tulpini bacteriene de origine umană și animală. Mai mult decât atât, tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la șobolanul maro (*Rattus norvegicus*) au prezentat similitudini genetice cu tulpinile de *E. coli* producătoare de ESBL izolate de la oameni (Guenther ș.a.,2010; Wannaprasat ș.a.,2011; Gandolfi-Decristophoris ș.a.,2013). De asemenea o tulpină virulentă de *E.coli* producătoare de ESBL izolată de la un șobolan din Berlin a aparținut grupului clonal ST95, grup cheie din care fac parte tulpinile de *E.coli* extraintestinale patogene pentru om (Guenther ș.a.,2012). În ceea ce privește specificitatea bacteriilor, colonizarea nu este un factor care să influențeze schimbul de gene de rezistență, transferul orizontal putând avea loc între bacterii care traversează tractul intestinal, de aceea enterococii de la animale pot pătrunde în mediul spitalicesc și pot realiza schimbul de gene de rezistență cu tulpinile bacteriene din spital (Heuer ș.a., 2006).

Elemente genetice mobile, cum ar fi transpozonii sau integronii sunt responsabile și capabile să transfere lateral între specii, genele ce codifică enzimele ESBL determinând infecții oportuniste (Sunde ș.a., 2006; Shaheen ș.a., 2011). De exemplu administrarea tratamentelor cu antimicrobiene și utilizarea

promotorilor de creștere în ferme ar putea determina selectarea de tulpini de *Salmonella spp.* rezistente, izolate care în circumstanțe adecvate ar putea ajunge în produsele alimentare. Chiar dacă tulpinile de *Salmonella spp.* menționate anterior ar putea fi distruse în timpul procesului de preparare, în carnea de pui crudă sau insuficient preparată termic bacteriile ar putea supraviețui și intra în lanțul alimentar uman și astfel să realizeze schimb de material genetic cu bacterii patogene umane. În contextual menționat anterior, tratamentele cu antibiotice utilizate în managementul infecțiilor bacteriene la animale și produsele din carne contaminate reprezintă o amenințare demnă de luat în considerare la adresa sănătății umane (Chiu ș.a.,2004; Silva ș.a.,2012; Wong ș.a.,2013).

Deși utilizarea antibioticelor a avut efecte majore în terapia bolilor infecțioase în medicina umană și deopotrivă și în medicina veterinară, pentru aceasta din urmă ducând și la creșterea productivității și chiar la eradicarea unor boli, cu toate acestea se pare că a existat și reversul medaliei fiind cunoscut faptul ca terapia antimicrobiană este principala cauză a apariției rezistenței la antibiotice și este principalul factor de risc în apariția enzimelor ESBL. Pentru a limita acest fenomen și a fi ținut sub control este important să se identifice principalii factor de risc în apariția ESBL. Argumentele prezentate anterior susțin și dovedesc că animalele pot constitui un rezervor de tulpini bacteriene producătoare de ESBL pentru om, iar similitudinile dintre profilurile de rezistență influențează rezultatul tratamentului cu antibiotice: orice tratament antimicrobian fără succes la animale reprezintă un risc pentru om și invers, ca urmare a legăturii strânse dintre consumul de antibiotice și apariția rezistenței.

Având o imagine de ansamblu asupra efectelor și implicațiilor fenomenului de rezistență antimicrobiană la scară largă, în contextul “One health”, este esențial să se limiteze consumul de antibiotice în medicina veterinară, iar substanțele antimicrobiene cu impact în medicina umană să fie considerate antibiotice de rezervă pentru terapia bolilor infecțioase cauzate de bacterii multidrug rezistente. De asemenea conceperea unor programe strategice care să realizeze screening-ul tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL la animale sunt necesare dacă luăm în considerare riscul de rezervor pe care îl pot avea animalele și evoluția relațiilor dintre om și animale de-a lungul timpului.

CAPITOLUL II. METODE FENOTIPICE ȘI GENOTIPICE DE DETECȚIE A TULPINILOR PRODUCĂTOARE DE ESBL

CHAPTER II. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS FOR THE DETECTION OF STRAINS PRODUCING ESBL

2.1. Metode fenotipice de identificare a tulpinilor producătoare de ESBL

În anul 1999 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) a publicat metodele recomandate pentru screening-ul tulpinilor de *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Klebsiella oxytoca* (M100-S9) (NCCLS, 1999).

Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL implică 2 etape: testele de screening pentru rezistența la oximino-cefalosporine și testele de confirmare fenotipică bazate pe inhibiția ESBL-urilor de către acidul clavulanic. De a lungul timpului au apărut mai multe metode de detectare rapidă a germenilor ESBL, acestea având la bază medii cromogene, sisteme automate sau metode moleculare.

Principiul de bază în cazul metodelor de screening constă în determinarea rezistenței la cefalosporine de generația a treia (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxone, cefpodoxim). În tabelul 2.1. sunt sintetizate valorile pentru diametrele zonelor de inhibiție sau CMI-ul pentru a considera rezistentă la cefalosporine de generația a treia o tulpină de *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* sau *Klebsiella oxytoca* (CLSI, 2014).

Tabelul 2.1. / Table 2.1.

Valorile recomandate de CLSI pentru interpretarea screening-ului ESBL Recommended CLSI values for ESBL screening

Antibiotic	μg	Diametrul zonei de inhibiție (rezistent)	CMI
		<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> și <i>K.oxytoca</i>	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> și <i>K.oxytoca</i>
ceftriaxone	30	≤ 25mm	≥ 2 μg/ml
ceftazidim	30	≤ 22mm	≥ 2 μg/ml
cefotaxim	30	≤ 27mm	≥ 2 μg/ml
cefpodoxim	10	≤ 17mm	≥ 8 μg/ml

Mediile cromogene au încorporate una din cefalosporinele amintite anterior, iar tulpinile rezistente sunt detectate fie prin creșterea pe aceste medii, fie prin modificarea culorii coloniilor. Medii cromogene ESBL cunoscute sunt ChromID ESBL și ESBL-Bx (BioMérieux, Franța) sau Brilliance ESBL (Oxoid, Marea Britanie) (Glupczynski ș.a., 2007; Sturød ș.a., 2014). Marele avantaj al utilizării mediilor cromogene pentru screening-ul ESBL este reprezentat de rapiditatea acestora în detectarea germenilor producători de enzime beta-lactamaze cu spectru extins. Mediile de cultură prezentate anterior sunt recomandate de sensibilitatea și specificitatea ridicată a acestora, astfel ChromID ESBL are o sensibilitate variabilă între 88,2% și 97,3% și o specificitate între 90,4 și 95,5%, iar pentru Brilliance ESBL sensibilitate este variabilă între 94,9% și 100% și specificitatea între 93,3% și 95,7% (Willems E. et al., 2013).

Confirmarea fenotipică a tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL poate fi realizată prin mai multe metode ce se bazează pe:

1. inactivarea unui substrat cromogen (testele rapide);
2. inactivarea antibioticului utilizând teste tridimensionale;
3. inhibarea enzimelor ESBL de către acidul clavulanic (cea mai precisă metodă).

1. Testele rapide

Cele mai cunoscute teste rapide sunt β -Lacta test (Bio-Rad, Franța) și Cica- β -Test (Kanto Chemical, Japonia), ambele conțin HMRZ-86, o nouă cefalosporină cromogenă utilizată pentru detecția beta-lactamazelor (Livermore ș.a., 2007; Renvoisé ș.a., 2013; Gallah ș.a., 2014).

β -Lacta test evidențiază germenii producători de ESBL și MBL (metalo-beta-lactamaze) cu excepția ESBL-urilor TEM-1 și SHV-1, rezultatul pozitiv fiind interpretat prin schimbarea culorii mediului din galben în roșu. Sensibilitatea acestui test pentru tulpinile de *E.coli* și *K. pneumoniae* este variabilă între 96% și 100%, iar specificitatea este de 100% (Renvoisé ș.a., 2013).

Cica- β -Test este mult mai specific deoarece utilizează inhibitori specifici pentru fiecare clasă de beta-lactamaze. Spre deosebire de testul precedent, lipsa culorii roșie în cazul testului Cica- β -Test este interpretat ca rezultat pozitiv. Sensibilitatea pentru acest test variază între 74-96%, iar specificitatea între 57-98% (Livermore ș.a., 2007; Willems ș.a., 2013).

2. Testele tridimensionale

Testele tridimensionale sunt folosite pentru a testa activitatea hidrolitică a ESBL-urilor împotriva unui antibiotic utilizat ca indicator. Există două tipuri de teste 3D: directe și indirecte. Ambele tipuri de teste au dezavantajul că necesită un volum mare de muncă și uneori se obțin rezultate fals pozitive sau nespecifice.

În testele 3D directe se obține mai întâi izolatul ce trebuie testat și apoi se realizează o cultură în gazon pe mediul Müller Hinton. În mijlocul plăcii se plasează un microcomprimat de cefotaxim/ ceftazidim/ ceftriaxon și aproape de acesta se distribuie o cantitate mică de cultură din izolatul ce urmează a fi testat. Dacă izolatul este producător de ESBL inactivează antibioticul și zona de inhibiție va fi distorsionată. Această metodă este valabilă doar dacă izolatul ce trebuie testat produce o anumită zonă de inhibiție în jurul antibioticului.

În cazul testelor 3D indirecte limitarea menționată anterior este depășită deoarece se utilizează pentru obținerea culturii în gazon o tulpină de ATCC care 25922 care este sigur sensibilă la antibioticul utilizat ca indicator (Thomson ș.a.,1992; Menon ș.a., 2006).

3. Teste bazate pe inhibiția ESBL de către acidul clavulanic

Inhibarea enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins este o caracteristică esențială pentru descrierea acestora, din aceste considerente utilizarea testelor care au la bază acest principiu este de preferat pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor producătoare de ESBL. Există mai multe teste recunoscute care utilizează acest principiu, dintre acestea amintim: testul de sinergie între două microcomprimate (DDST), testul difuziei cu un inhibitor potențat (Inhibitor-potentiated disk diffusion-IPD), metoda discurilor combinate, E-test și sistemele automate de identificare a tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins.

Testul sinergiei între două microcomprimate (DDST) a fost propus de către Jarlier și col. în anul 1988 (Jarlier ș.a.,1988). Metoda are la bază tehnica difuzimetrică de realizare a unei antibiograme: o placă Petri cu mediul Müller Hinton se însămânțează prin ștergere cu o diluție din tulpina bacteriană de testat, diluție a cărei turbiditate corespunde cu turbiditatea 0,5McFarland. În centrul plăcii este dispus un microcomprimat de amoxicilină/ acid clavulanic 20/10μg, iar la distanțe de 20-30mm de o parte și de alta se plasează microcomprimate cu cefotaxim și ceftazidim 30μg sau cefpodoxim 10μg. Rezultatul pozitiv se interpretează prin deformarea zonei de inhibiție a cefalosporinelor cu extinderea zonei de inhibiție către microcomprimatul de amoxicilină/acid clavulanic (aspect de dop de șampanie). Dezavantajele testului sunt reprezentate de sensibilitatea și specificitatea scăzute ca urmare a variațiilor distanței de plasare a microcomprimatelor, citirea subiectivă de către cercetător, alegerea antibioticului și de tipul de ESBL produs de microorganism. Sensibilitatea variază între 55-100% și specificitatea între 72-100% (Shin ș.a.,2002; Bedenic ș.a.,2007; Drieux ș.a.,2008).

Testul difuziei cu un inhibitor potențat (Inhibitor-potentiated disk diffusion-IPD) presupune utilizarea unei plăci Petri cu mediul Müller Hinton simplu și o placă cu mediul Müller Hinton suplimentat cu 4μg/ml soluție de acid

clavulanic. Ambele plăci sunt inoculate prin ștergere cu diluția 0,5McFarland a culturii bacteriene ce trebuie testată, se plasează în fiecare placă microcomprimate de cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon și aztreonam și se incubează peste noapte la 37°C.

O diferență $\geq 10\text{mm}$ a diametrului zonei de inhibiție din jurul discurilor din placa cu mediu suplimentat cu acid clavulanic comparativ cu discurile din placa doar cu Müller Hinton indică un rezultat pozitiv, ceea ce înseamnă că tulpina testată este producătoare de enzime ESBL (Ho ș.a.,1998).

Ca și în cazul testului precedent, sensibilitatea testului este influențată de alegerea antibioticului și de tipul de ESBL produs de microorganism.

În general sensibilitatea testului este variabilă între 55-100%, iar specificitatea este ridicată fiind de aproximativ 100%. Atunci când diferența de diametru este de 5 mm, sensibilitatea testului crește, însă specificitatea scade (Ho ș.a.,1998; Bedenic ș.a., 2007).

Această metodă oferă rezultate bune, însă dezavantajul este reprezentat de necesitatea soluției stoc de acid clavulanic care este sensibilă la temperaturi și nu are o perioadă mare de conservare.

Metoda discurilor combinate este metoda recomandată de CLSI pentru confirmarea fenotipică a tulpinilor de *E.coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* producătoare de ESBL (CLSI, 2014). Poate fi realizată atât ca o antibiogramă difuzimetrică cât și prin estimarea CMI-ului. Ambele tehnici sunt cantitative și spre deosebire de testele amintite anterior, metoda discurilor combinate elimină interpretările subiective ale rezultatelor.

O placă cu mediu Müller Hinton se însămânțează prin ștergere cu diluția 0,5McFarland a culturii bacteriene ce urmează a fi testată. La distanțe cuprinse între 20-30mm între ele sunt plasate discurile de ceftazidim (30μg), ceftazidime+acid clavulanic (30/10μg), cefotaxim (30μg), cefotaxim+acid clavulanic (30/10μg) și apoi plăcile se incubează 24h la 37°C. O diferență $\geq 5\text{mm}$ între diametrele zonelor de inhibiție ale cefalosporinei și cefalosporinei potențate cu acid clavulanic indică fenotipic prezența enzimelor ESBL în cadrul tulpinii analizate (CLSI, 2014).

În tehnica CMI a aceleași metode, izolatul este testat cu diferite diluții ale ceftazidim 0,25-128μg/ml, ceftazidime+acid clavulanic 0,25/4-128/4μg/ml, cefotaxim 0,25-64μg/ml și cefotaxim+acid clavulanic 0,25/4-64/4μg/ml. O reducere ≥ 3 diluții de două ori mai mare pentru cefalosporina cu acid clavulanic comparativ cu CMI-ul cefalosporinei singure confirmă producția ESBL.

Deși prin ambele tehnici se obțin rezultate similare, metoda ce are la bază antibiograma difuzimetrică este mai puțin costisitoare și mai ușor de realizat. Pentru ambele tehnici sensibilitatea și specificitatea sunt mai mari de 90% (Ercis ș.a., 2007; Gallah ș.a., 2014)

Izolatele care produc KPC-beta-lactamaze și K1-beta-lactamaze genetic dispuse la nivel cromozomial pot determina rezultate fals pozitive, în timp ce izolatele care produc ESBL și AmpC-beta-lactamaze în aceeași tulpină bacteriană pot determina rezultate fals negative (Ercis ș.a.,2007; Gallah ș.a.,2014).

Metoda E-test (BioMérieux, Franța) presupune utilizarea unor benzi subțiri cu dimensiunea de 5 X60mm realizate din plastic neporos. Pe una din fețele stripului E-test se găsește inscripționat CMI-ul în $\mu\text{g/ml}$, iar pe partea opusă sunt impregnate concentrații diferite pentru cele două antibiotice.

Există două benzi E-test pentru detectarea tulpinilor producătoare de ESBL, utilizarea ambelor fiind o condiție obligatorie pentru confirmarea fenotipică a germenilor producători de ESBL. Una din benzi este impregnată la un capăt cu cefotaxim în concentrații variabile între 0,25-16 $\mu\text{g/ml}$, iar la capătul opus cefotaxim+acid clavulanic în concentrații cuprinse între 0,016-1 $\mu\text{g/ml}$ +4 $\mu\text{g/ml}$ acid clavulanic. Cealaltă bandă conține la un capăt ceftazidim în concentrații de 0,5-32 $\mu\text{g/ml}$ și în partea opusă ceftazidim+acid clavulanic 0,064-4 $\mu\text{g/ml}$ +4 $\mu\text{g/ml}$.

CMI-ul se va citi în punctul în care zona de inhibiție intersectează marginea benzii E-test.

Rezultatul este pozitiv și se confirmă fenotipic prezența enzimelor ESBL în cadrul tulpinii analizate atunci când fie CMI-ul pentru cefotaxim+acid clavulanic sau pentru ceftazidim+acid clavulanic este redus cu ≥ 3 diluții de două ori față de CMI cefotaxim sau ceftazidim, fie atunci când apare o elipsă sau deformarea zonei de inhibiție (Wiegand ș.a., 2007; Drieux ș.a.,2008).

Sensibilitatea metodei E-test este variabilă între 94-98%, iar specificitatea între 59-84%. Această metodă este convenabilă, însă dezavantajul este reprezentat de costurile ridicate pentru realizare și de asemenea oferă rezultate incerte în cazul tulpinilor producătoare și de ESBL și de AmpC-beta-lactamaze (Wiegand ș.a., 2007; Drieux ș.a., 2008; Plattel ș.a.,2013).

Sistemele automate de identificare a tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins au la bază caracteristica principală a acestor enzime, aceea de a fi inhibitate de acțiunea acidului clavulanic. Astfel de sisteme sunt reprezentate de Vitek Legagy și Vitek 2 (BioMérieux, Franța), MicroScan (Sistem Medical Solution Diagnostics), Sensititre (TREK Diagnostic Systems) și Phoenix (BD Diagnostic Systems). Studii comparative au arătat că aceste sisteme de identificare au o sensibilitate ce variază între 84-100% și specificitatea între 52-98% (Linscott ș.a.,2005; Wiegand ș.a.,2007; Drieux ș.a., 2008).

Sistemele automate oferă avantajul unui diagnostic rapid în cazul izolatelor clinice producătoare de ESBL, însă ca și în cazul metodei E-test marele dezavantaj este impus de costurile ridicate.

Diagnosticul fenotipic pentru tulpinile bacteriene producătoare și de ESBL dar și de AmpC-beta-lactamaze în același timp este dificil de realizat în acest sens au fost dezvoltate o serie de strategii pentru a reduce numărul de răspunsuri

fals pozitive sau negative la diferitele teste fenotipice. Enzimele AmpC-beta-lactamaze nu sunt inhibitate de acțiunea acidului clavulanic, prin urmare un răspuns pozitiv la acțiunea acestuia ar putea fi mascat în cazul tulpinilor purtătoare de gene ce codifică enzimele ESBL și AmpC. Deoarece acidul amino-fenilboronic și cloxacilin-ul sunt buni inhibitori ai enzimelor AmpC, testele ce au la bază inhibarea enzimelor ESBL de către acidul clavulanic ar putea fi modificate prin adăugarea în mediul Müller Hinton a 200μg/ml cloxacilin (Ho ș.a.,1998). De asemenea alți autori recomandă testul metoda discurilor combinate modificată care presupune suplimentarea discurilor de antibiotice cu 400μg/ml acid amino-fenilboronic (Song ș.a.,2007). Interpretarea unui rezultat pozitiv în situația menționată anterior presupune ca diametrul zonei de inhibiție pentru cefotaxim+acid clavulanic+acid fenilboronic să fie ≥ 5 mm comparativ cu diametrul zonei de inhibiție pentru cefotaxim+acid clavulanic (Song ș.a.,2007).

O altă metodă de a izola tulpinile ce sunt producătoare de ESBL și AmpC simultan este de a utiliza în testul sinergiei între două microcomprimate și cefepim 30μg, o cefalosporină de generația a-4 a a cărei acțiune nu este afectată de prezența enzimelor AmpC-beta-lactamaze, deoarece inhibă activitatea acestora (Pitout ș.a.,2003).

Alți autori au modificat testul recomandat de standardul CLSI, metoda discurilor combinate incluzând pe lângă celelalte antibiotice și cefepim și cefepim+acid clavulanic (Derbyshire ș.a.,2009).

Și metoda E-test modificată prin adăugarea pe lângă cele două benzi din E-test-ul clasic pentru ESBL și a unei benzi cu cefepim la un capăt și cefepim+acid clavulanic la celălalt capăt poate duce la izolarea tulpinilor producătoare de ESBL și AmpC simultan (Stürenburg ș.a.,2004).

Majoritatea laboratoarelor confirmă fenotipic prezența ESBL în cadrul tulpinilor testate după tehnica recomandată de standardul CLSI: metoda discurilor combinate.

2.2. Metode genotipice utilizate pentru identificarea markerilor de rezistență la antibiotice la tulpinile producătoare de ESBL

Detectare și identificarea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins (*bla*) au devenit exacte odată cu introducerea tehnicilor de secvențiere a nucleotidelor. Tehnicile de biologie moleculară sunt cele care certifică cu certitudine prezența genelor ce codifică enzimele ESBL în cadrul tulpinilor analizate.

2.2.1.Tehnica PCR și secvențierea

Reacția PCR constă în replicarea ADN-ului bacterian în vitro și presupune amplificarea unei secvențe țintă de ADN într-un număr mare de copii (Solcan C. ș.a., 2012).

Tehnica PCR clasică a fost descoperită de biochimistul american Kary Mullis în anul 1983. Principiile care stau la baza oricărui PCR sunt aceleași indiferent de tipul de ADN (www.yourgenom.org)

Componentele unei reacții PCR sunt reprezentate de:

-ADN-ul matriță ce a fost extras din proba de analizat și care urmează a fi testat;

- primerii, una din componentele importante ale reacției PCR și care inițiază întreg procesul de replicare a secțiunii de ADN ce urmează a fi copiată;

-deoxinucleotidtrifosfații (dNTP) ce sunt necesari pentru sinteza noii catene ADN. Aceștia se atașează la capătul primerilor, complementar cu matrița (spre deosebire de ADN-ul nativ ampliconul va conține deoxiuridină și nu deoxitimidină) (Măciucă, 2014).

-Taq ADN polimeraza care este o enzimă ce ușurează sinteza lanțului complementar de ADN;

-ionii de Mg ce au rol în producerea substratului propriu-zis recunoscut de ADN polimerază. Concentrația ionilor de Mg are o importanță crucială deoarece influențează activitatea Taq ADN polimerazei, excesul de ioni de Mg având ca rezultat creșterea amplificărilor nespecifice (Măciucă,2014).

Orice reacție PCR constă într-un ciclu repetitiv de temperaturi, desfășurate pe parcursul a trei etape:

-denaturarea care are loc la 95°C și care constă în ruperea catenei de ADN dublu catenar și separarea lui în două catene;

-hibridizarea primerilor, etapă ce se desfășoară la temperaturi de 45-68°C și care constă în atașarea primerilor pe bază de complementaritate la capetele 3' ale celor două catene de ADN;

-elongația se desfășoară la 72°C și este etapa în care se reface ADN-ul dublu catenar în prezența Taq ADN polimerazei care este termostabilă în prezența ionilor de Mg și a excesului de deoxinucleotidtrifosfații. Practic aceasta este etapa în care se formează ampliconul (Solcan ș.a.,2012).

Analizatorul va repeta procesul descris anterior pentru un anumit număr de cicluri (de cele mai multe ori 30-35), în cadrul fiecărui ciclu dublându-se cantitatea de ampliconi ADN (Solcan ș.a.,2012).

Utilizând primerii adecvați, întreaga genă *bla* poate fi amplificată prin metoda PCR. Pentru o acuratețe exactă se recomandă ca întreaga genă *bla* să fie amplificată și secvențializată. PCR-ul poate fi realizat fie simplex (detectează o singură genă) fie multiplex, ultimul având capacitatea de a detecta mai multe gene *bla* în același timp și la un cost mai mic (Colom ș.a.,2003; Woodford ș.a., 2006).

Deoarece metodele de detectare și validare utilizate în PCR-ul clasic sunt laborioase, a fost dezvoltat Real-time PCR multiplex cu ajutorul căruia utilizând primerii și sondele adecvate se pot detecta mai multe tipuri de gene simultan și

între-un timp mult mai scurt. Dezavantajul tehnicii menționate anterior este reprezentat de gradul de reproductibilitate care uneori poate fi limitat (Birkett ș.a.,2007; Bustin ș.a.,2009).

Secvențierea ADN-ului permite determinarea ordinii celor 4 baze azotate (adenină, guanină, citozină și timină) într-o catenă ADN.

Există mai multe metode de determinare a secvenței nucleotidice, însă cele mai cunoscute sunt fie prin degradare chimică (tehnica descoperită de Allan Maxam și Walter Gilbert între 1976 și 1977), fie prin sinteză enzimatică (metodă descoperită de Frederick Sanger în 1970).

Secvențierea Sanger impune utilizarea unei enzime de ADN polimerază purificată în vederea sintezei lanțurilor de ADN de diferite lungimi. Caracteristica acestei metode constă în includerea de bi-deoxinucleotidtrifosfații (ddNTPs) (www.nature.com).

Tehnica Sanger constă în patru reacții de secvențiere care se desfășoară în paralel pentru a secvenția o singură probă. Fiecare reacție necesită o monocatenă matrită de ADN, un primer specific care să inițieze reacția, deoxinucleozidtrifosfatate normale (dNTP), ADN polimeraza și cele patru di-deoxinucleozidtrifosfatate modificate (ddNTPs), ultima componentă terminând prematur elongarea șirului ADN (Sanger ș.a.,1975; Sanger ș.a.,1977).

În cadrul tehnicii Sanger sinteza este stopată prin atașarea unui dideoxinucleozid trifosfat, marcat fluorescent. ddNTPs conțin în poziția 3' grupa -H dar nu și grupa -OH care împiedică polimerizarea nucleotidelor. Utilizarea a patru analogi ddNTPs diferiți pe parcursul sintezei catenei noi de ADN permite identificarea fiecărui nucleotid normal din catena matrită. Cu ajutorul electroforezei poate fi citită ordinea nucleotidelor în molecula de ADN (Măciucă, 2014; www.redox.com.ro).

Astăzi se utilizează o metodă automată de secvențiere, ce are la bază tehnica Sanger. Spre deosebire de tehnica dideoxi, metoda automată presupune utilizarea unor terminatori de catenă marcați fluorescent, astfel cele 4ddNTPs sunt marcate diferit cu câte un fluorocrom. Reacția se desfășoară într-o singură eprubetă, fragmentele obținute fiind separate prin electroforeză. Ordinea nucleotidelor este citită cu ajutorul unui laser și apoi sunt captate de către un software care convertește datele în secvențe nucleotidice (Măciucă,2014; www.redox.com.ro).

Secvențele se obțin fie în format text, fie în format ABI (electroforegrame) ce sunt interpretate apoi și analizate cu ajutorul unor programe informatice cum sunt BioEdit, Mega, preGAP/gap4 etc. (Măciucă, 2014).

2.2.2. Identificarea plasmidelor bacteriene prin tehnica PCR Based replicon typing (PBRT)

Plasmidele sunt cantități finite de ADN extracromozomial capabile de transfer genetic între tulpini bacteriene ale aceleși specii sau specii diferite. Sunt elemente genetice extrem de mobile iar astăzi numele lor este asociat cu transferul de gene de rezistență, acordându-se o importanță deosebit caracterizării lor ca urmare a rapidității și ușurinței cu care reușesc să transfere orizontal rezistența la antibiotice.

Familia *Enterobacteriaceae*, la care apare cel mai des fenomenul de antibioretistență prin mecanismul determinat de enzime ESBL au fost descrise analizând originile de replicare similare (aceleși replicon typing) peste 30 de grupuri de incompatibilitate plasmidială (Carattoli,2009; Bertini ș.a.,2010).

Tehnica PCR-based replicon typing (PBRT) are la bază tehnica PCR și permite caracterizarea rapidă și ușoară a plasmidelor prin detecția repliconilor. Această metodă a fost dezvoltată inițial de Carattoli A. (Carattoli,2005).

Metoda are la bază 8 teste standard optimizate pentru a efectua 8 PCR-multiplex pentru a replica 28 de repliconi reprezentativi pentru principalele grupe de plasmide de incompatibilitate care mediază și difuzează rezistența la antibiotice între enterobacterii (Carattoli,2005). Plasmidele de dimensiuni mici (2-15kb) ce nu conțin repliconi și care nu pot influența numărul de copii și de replicări nu pot fi detectate prin tehnica PBRT.

Dezavantajul tehnicii PBRT constă în limitările impuse de identificarea repliconilor noi, PBRT identifică și clasifică doar plasmidele care aparțin grupelor clasice Inc (Carattoli,2009).

Plasmidele, în special plasmidele din grupul de incompatibilitate IncF joacă un rol important în diseminarea rezistenței la antibiotice a enterobacteriilor (Villa ș.a.,2010). Caracterizarea și clasificarea corectă a acestora este o condiție esențială în înțelegerea și limitarea transmiterii antibioretistenței intraspecie sau interspecie.

2.2.3. Experimente de transmitere genetică prin conjugare (sexducție)

Procesul de conjugare la bacterii a fost descris pentru prima dată în 1946 de către Lederberg fiind observat la tulpina de *E.coli* K12, ulterior fiind identificat și la alte specii bacteriene. Această modalitate de recombinare genetică este principala cale de transfer orizontal de material genetic între bacterii, întâlnit mai ales la Gram-negative.

Procesul de conjugare este unidirecțional, unul dintre conjugăți fiind donatorul, iar celălalt receptorul, contactul dintre ei realizându-se printr-o punte protoplasmatică. Bacteria donatoare posedă un element numit factor de fertilitate sau F^+ (plasmid conjugativ) care este responsabil de modificările ce au loc în constituenții proteici din membrana celulară a donatorului. Fiecare conjugant

donator posedă mai mulți factori de fertilitate și în timpul procesului de conjugare fiecare conjugant receptor (numit F^-) primește cel puțin câte un asemenea factor F^+ . Există donatori mutanți numiți *Hfr* ce au capacitatea de a transmite grupe foarte mari de gene, plasmida F la aceștia fiind integrată în cromozomul celulei donatoare, la nivelul unei regiuni pentru care plasmida are o afinitate specială. Atunci când factorul F este integrat, acesta își pierde capacitatea de a se replica independent, replicarea având loc pasiv odată cu genele cromozomiale. Factorul F integrat duce la ruperea cromozomului bacterian în timpul conjugării și astfel ADN-ul cromozomial este transferat cu eficiență mai mare. În cazul bacteriilor *Hfr* transferul de material genetic începe din vecinătatea locului de inserție a plasmidului F , situație în care deoarece acesta este ultimul transferat, cel mai frecvent bacteria receptor rămâne F^- (Ravin, 1969; Măciucă, 2014).

ADN-ul de transfer de conjugare constituie mecanismul central prin care factorii de rezistență la antibiotice și virulență sunt difuzați în populațiile bacteriene.

Cunoașterea factorului de rezistență la antibiotice (fR) este foarte importantă, atât din punct de vedere terapeutic cât și din punct de vedere medical, rezistența la antibiotice prin acest factor fiind mult mai frecventă decât rezistența dobândită cromozomial.

Factorul fR transferabil este o moleculă de ADN ce conține un număr variabil de determinanți de rezistență, echivalenții genelor de rezistență și un factor de transfer (RTF). Fiecare determinant conține informația de rezistență față de un anumit antibiotic sau grupă de antibiotice. În cazul bacteriilor Gram-negative fR poate deține determinanți de rezistență pentru toate antibioticele și chimioterapicele cunoscute: tetraciline, peniciline, sulfamide, cefalosporine, macrolide, polimixine etc. În cadrul aceluiași plasmid poate exista un singur determinant (monorezistență) sau pot exista 6-8 (multirezistență), ceea ce înseamnă că având în vedere rezistența încrucișată un singur fR poate transmite rezistență față de 10-15 antibiotice.

În cazul bacteriilor Gram-negative, RTF (factorul de transfer) este factorul de fertilitate (F^+) care inițiază procesul de conjugare prin formarea de pili sexuali prin care se atașează de receptorii specifici de pe suprafața unei celule receptor, după această etapă are loc transferul în întregime, inclusiv RTF, sau parțial al factorului de rezistență la antibiotice fR . Variația spectrului de rezistență la antibiotice de la tulpină la tulpină se explică prin faptul că numărul de gene transferate variază în funcție de durata conjugării.

Procesul de conjugare, rămâne mecanismul principal de transmitere a rezistenței la antibiotice între bacteriile Gram-negative.

2.2.4. Tehnica de amplificare randomizată a ADN ului polimorfic (RAPD) și Electroforeza în câmp pulsatoriu (PFGE)

Tehnica de amplificare randomizată a ADN ului polimorfic (RAPD) este utilizată în analiza diversității genetice a mai multor specii de plante și animale utilizând primeri aleatorii (Olivier ș.a.,1999). Amplificarea randomizată a ADN-ului polimorfic are la bază tot o reacție PCR în care segmentele de ADN care sunt amplificate sunt aleatoare (Williams ș.a.,1990). Dacă în cazul PCR-ului se cunoaște segmentul de ADN căutat, în cazul RAPD-ului nu este necesară cunoașterea exactă a unui segment de ADN țintă.

Se utilizează un singur primer scurt cu dimensiunea de 8-12 nucleotide care se atașează aleator în genomul analizat, doar acolo unde există omologie genetică și se vor obține în final fragmente scurte de ADN ce vor fi apoi analizate.

PCR-ul este o reacție enzimatică, în concluzie concentrația și calitatea ADN-ului, concentrațiile componentelor și ciclurile PCR pot influența foarte mult rezultatul de aceea se recomandă ca protocolul de lucru să fie optimizat pentru a se asigura reproductibilitatea tehnicii RAPD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Electroforeza în câmp pulsatoriu (PFGE) este o tehnică ce a fost descrisă încă din anul 1985 de către Carle și Oslon din necesitatea de a observa fragmente de ADN a căror mărime variază între 50kb și peste 1000kb (Solcan, 2008). Multimeri ai genomului bacteriofagului lambda sau cromozomi de *Saccharomyces cerevisiae* sunt utilizați ca și standarde de mărime.

Principiul metodei constă în modificarea direcției unui câmp electric în gel de agaroză influențând astfel elasticitatea ADN-ului și indirect mobilitatea sa. Elasticitatea ADN-ului este dependentă de mărimea acestuia: elasticitatea va fi invers proporțională cu dimensiunile moleculei de ADN. În cazul fragmentelor de ADN de dimensiuni mari mobilitatea este mai puțin importantă. Fragmentele de ADN sunt supuse la câmpuri electrice alternative, a căror orientare relativă poate varia în funcție de sistem, de la 90-180°. Curentul electric va schimba alternativ direcția ducând la reorientarea constantă a fragmentelor de ADN.

ADN-ul analizat prin electroforeza în câmp pulsatoriu necesită un proces specific de purificare. În vederea vizualizării genomului în ansamblu, adică a fragmentelor de ADN cu greutate moleculară mare se utilizează enzime de restricție (endonucleaze) cu frecvență mică de tăiere (Solcan,2008).

Probele analizate prin tehnica PFGE nu pot fi purificate prin metoda clasică de extracție a ADN-ului cu ajutorul fenol/cloroform-ului. În vederea degradării învelișului celular extern, celulele sunt acoperite de o matrice de agaroză și lizate în situ. Următoarea etapă presupune eliberarea conținutului celular și degradarea proteinelor celulare în acest scop utilizându-se acțiunea conjugată a unui detergent și a proteinazei K. În urma acestor etape preliminare, ADN-ul rămâne fixat în agaroză, secționarea acestuia de către endonucleazele de restricție realizându-se în interiorul blocului de agaroză (Solcan,2008).

Separarea fragmentelor de ADN la o anumită mărime depinde de mai mulți factori, însă parametrul principal care permite optimizarea procesului este timpul de aplicare a câmpului electric la fiecare orientare, adică timpul de pulsație (Solcan,2008).

2.2.5. Tehnica MLST-Multilocus sequence typing

Multilocus sequence typing (MLST) este o tehnică de biologie moleculară ce combină secvențierea moleculară cu bioinformatica în vederea caracterizării și stabilirii pe termen lung a epidemiologiei și evoluției speciilor bacteriene (Tibayrenc,2007; Urwin ș.a.,2003).

Este o tehnică simplă ce se bazează pe capacitatea de a amplifica fragmente de ADN prin PCR și de a secvenția apoi fragmentele obținute utilizând un secvențiator automat (Maiden ș.a.,1998).

Șapte fragmente de gene de aproximativ 500bp (așa numitele “housekeeping”) sunt amplificate prin PCR și secvențiate. Pentru fiecare secvență unică se atribuie o anumită alelă distinctă și fiecărei combinații de alele îi este atribuit un tip de secvență distinctă (ST). În urma amplificării și secvențierii fragmentelor obținute se obține o combinație de 7 numere ce va corespunde alelelor analizate și pe baza acesteia se obține tipul de secvență sau profilul alelic (Maiden ș.a.,1998).

Marele avantaj al tehnicii MLST este reprezentat de lipsa de ambiguitate a rezultatelor obținute astfel că profilurile alelice obținute pot fi ușor comparate într-o bază de date centrală internațională.

Caracterizarea moleculară a tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL presupune pe lângă stabilirea genelor ce determină aceste enzime și încadrarea în grupurile clonale din care fac parte. Acest lucru este posibil cu ajutorul MLST-ului, un exemplu concludent în acest sens fiind încadrarea tulpinilor de producătoare de ESBL din categoria CTX-M-15 ca aparținând grupului clonal pandemic ST131:O25.

După prima identificare a tulpinilor producătoare de ESBL în anul 1983, interesul față de aceste enzime a fost în continuă creștere. Stabilirea unui protocol de lucru privind screening-ului, confirmarea fenotipică și caracterizarea moleculară a enzimelor ESBL este necesar pentru a stabili sursa acestor enzime, direcția și mecanismul de transmitere, precum și management-ul terapiei infecțiilor ESBL. Analizând riscurile ESBL prin prisma conceptului “One health” existența unor subiecte de cercetare comună între medicina umană și medicina veterinară este o condiție sine qua non pentru a stabili impactul izolării tulpinilor producătoare de ESBL de la animale sau produse alimentare asupra sănătății publice.

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

CAPITOLUL III. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

CHAPTER III. AIM AND OBJECTIVES OF THE THESIS

Subiectul antibioretistenței este unul îndelung cercetat și de mare interes în ultimii ani ca urmare a impactului asupra sănătății publice și a efectelor dezastruoase pe care le atrage după sine pe termen lung.

Utilizarea abuzivă și uneori irațională a substanțelor antimicrobiene în tratarea infecțiilor bacteriene în medicina umană și/sau veterinară, administrarea profilactică a acestor substanțe în hrana animalelor de rentă și de asemenea utilizarea lor în agricultură a contribuit pe termen lung la apariția, dezvoltarea și întreținerea fenomenului de antibioretistență.

Unul din mecanismele de rezistență la antibiotice cel mai des incriminat este cel determinat de enzimele beta-lactamază cu spectru extins (ESBL). Producția de ESBL este facilitată de amplasarea genelor care codifică aceste enzime pe elemente genetice foarte mobile ce pot fi ușor transferate prin procesul de conjugare nu doar în cadrul aceleiași specii bacteriene, ci și între diferite specii (Măciucă ș.a, 2015).

La nivel mondial au fost realizate numeroase studii ce au avut ca scop caracterizarea fenotipică și genotipică a tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL de origine umană și animală. (Măciucă ș.a.,2015).

În România, cercetările pe tema antibioretistenței și portajului de bacterii producătoare de beta-lactamază cu spectru extins sunt rare și au fost realizate mai ales pe tulpini de origine umană (Licker ș.a., 2012). În medicina veterinară, în țara noastră subiectul a fost abordat în exclusivitate doar prin prisma analizei și stabilirii portajului tulpinilor producătoare de ESBL izolate din cecumul puilor și de la lucrători din abatoare (Măciucă, 2014; Măciucă ș.a, 2015).

Tema aleasă pentru realizarea acestei teze de doctorat a apărut ca urmare a lipsei de informații în ceea ce privește portajul și importanța epidemiologică a animalelor de companie în circuitul în natură a bacteriilor producătoare de ESBL. *Enterobacteriaceae*le sunt tulpini bacteriene ce fac parte din microbiota normală a tubului digestiv atât la om cât și la animale. Tratatamentul de primă intenție al infecțiilor bacteriene atât în medicina umană cât și în medicina veterinară este reprezentat de antibioticele din clasa beta-lactamine, ceea ce creează o presiune selectivă pentru aceste bacterii. De asemenea odată cu trecerea timpului, legătura dintre om și animale a fost într-o continuă evoluție, astăzi existând o coabitare strânsă între om și animalele de companie. Factori menționați anterior constituie argumente suficiente pentru a ne întreba care este rolul animalelor de companie în circuitul transmiterii bacteriilor producătoare de ESBL.

Scopul acestui studiu este de a determina prevalența bacteriilor producătoare de ESBL la câinii de companie și proprietarii lor, precum și la alte grupe sociale care sunt în contact cu animalele de la care s-au recoltat probele (personal sanitar-veterinar/personal din adăposturi pentru câini) din regiunea Moldovei. De asemenea, s-a urmărit caracterizarea fenotipică și moleculară a izolatelor de *Enterobacteriaceae* producătoare de ESBL pentru a putea compara datele obținute cu cele din studii similare din alte părți ale lumii. În final, prin stabilirea unor omologii genetice între tulpinile producătoare de ESBL de origine umană și animală, acest studiu urmărește să identifice eventualele schimburi de tulpini bacteriene și rolul pe care animalele de companie îl pot avea în circuitul transmiterii bacteriilor producătoare de ESBL.

Ipoteza principală de testat este dacă animalele de companie pot constitui o sursă de bacterii producătoare de ESBL pentru proprietari sau personalul sanitar veterinar. Pentru a realiza acest obiectiv, în perioada 2013-2016 au fost recoltate probe de fecale atât de la animalele de companie cât și de la proprietari, precum și din adăposturi de animalele și de la personalul din aceste adăposturi. S-a urmărit analiza moleculară a izolatelor producătoare de ESBL obținute pentru a identifica genele de rezistență prezente precum și plasmidele care pot contribui la diseminarea acestor gene.

Obiectivele principale ale acestei cercetări au fost:

- determinarea prevalenței bacteriilor producătoare de ESBL la grupele investigate (câini de companie, proprietari, animale din adăposturi și personal sanitar-veterinar);
- izolarea și identificarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la categoriile de subiecți analizați;
- confirmarea fenotipică a izolatelor producătoare de ESBL prin metoda discurilor combinate;
- caracterizarea fenotipului de rezistență la alte clase de antibiotice ale tulpinilor confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL;
- analiza moleculară a probelor pozitive la screening-ul ESBL pentru caracterizarea genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL dar și rezistența la alte clase de antibiotice;
- identificarea tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele ce codifică enzimele ESBL;
- analiza diversității genetice a tulpinilor de *E.coli* producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie și cele izolate de la proprietari prin identificarea grupurilor filogenetice precum și a înruderii genetice prin tehnica Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD);
- realizarea unui experiment de conjugare pentru a confirma amplasarea genelor de rezistență pe plasmide și identificarea plasmidelor implicate în transmitere .

CAPITOLUL IV. SCREENING-UL FENOTIPIC PENTRU DETECȚIA TULPINILOR DE ENTEROBACTERII PRODUCĂTOARE DE ESBL

CHAPTER IV. PHENOTYPIC SCREENING FOR THE DETECTION OF ESBL *ENTEROBACTERIACEAE* STRAINS PRODUCING ESBL

Portajul fecal de producătoare de ESBL la animalele de companie este un subiect de cercetare neabordat în România și de interes mai ales prin prisma caracterului zoonotic al acestor bacterii și al implicațiilor pe care le-ar putea avea asupra sănătății publice.

În acest capitol sunt descrise metoda de recoltare a probelor, metoda utilizată pentru screening-ul tulpinilor prezumptiv ESBL și confirmarea fenotipică a acestora precum și încadrarea taxonomică a izolatelor. De asemenea este descrisă tehnica pentru testarea sensibilității tulpinilor izolate la antibiotice din alte clase antimicrobiene în vederea încadrării acestora în categoria MDR ("multidrug resistant").

4.1. Recoltarea probelor

Recoltarea probelor s-a realizat pe parcursul anilor 2013-2016 și a urmărit două direcții:

- pe de o parte, pentru a crește șansele de izolare a bacteriilor producătoare de ESBL, recoltarea probelor de la animale (câini, pisici și cai) a fost efectuată de la nivel rectal cu ajutorul tampoanelor sterile;

- pe de altă parte, de la proprietarii animalelor sau personalul sanitar veterinar ce a intrat în contact cu subiecții analizați recoltarea probelor de fecale s-a realizat cu ajutorul coprocultoarelor sterile.

Din punct de vedere a regiunii luate în studiu, probele au fost recoltate din 3 județe: Iași, Tulcea și Vaslui.

În ceea ce privește mediul de proveniență a subiecților analizați, recoltarea s-a realizat de la animale ce au venit la cabinetele veterinare, padoc sau de la cele care s-au prezentat la Laboratorul de Microbiologie al Facultății de Medicină Veterinară Iași.

În tabelul 4.1. sunt sintetizate schematic datele referitoare la probele analizate pe parcursul anilor 2013-2016.

Tabelul 4.1. / Table 4.1.

Proveniența și numărul de probe de fecale analizate în acest studiu
The origin and number of faeces analyzed in this study

Regiune	Câini	Pisici	Cai	Proprietari/Personal sanitar veterinar
Padoc Iași	58	-	-	8
Padoc Tulcea	30	-	-	1
Padoc Bârlad	22	-	-	-
Cabinete Iași	65	37	-	42
Hergheleie Iași	-	-	16	-
Total probe per specie	175	37	16	51
Total probe analizate	228			51

4.2. Screening-ul ESBL utilizând un mediu cromogen înalt selectiv

După recoltarea probelor de fecale în condițiile menționate la subcapitolul 4.1., acestea au fost prelucrate în cadrul Laboratorului de Microbiologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași.

Deoarece numărul de agenți enterici este redus pe unitatea de volum, pentru toate eșantioanele rectale s-a realizat în prealabil o îmbogățire prin inocularea probelor cu bulion nutritiv Oxoid și incubarea lor la 37°C timp de 24h.

După etapa de îmbogățire, toate probele au fost însămânțate pe mediul Oxoid Brilliance ESBL Agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Acesta este specific pentru izolarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins. Cu ajutorul acestui mediu selectiv sunt izolate tulpinile de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter*, *Serratia spp* și *Citrobacter spp.* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins în doar 24h.

Oxoid Brilliance ESBL Agar utilizează o nouă formulă care îmbogățește selectivitatea mediului prin inhibarea selectivă a mecanismelor de rezistență AmpC, menținând în același timp un grad ridicat de sensibilitate pentru detectarea *Enterobacteriaceaelor* producătoare de ESBL (fig4.1.).

Conform specificațiilor producătorului, pe mediu gata preparat, culturile însămânțate și incubate la 37°C au următoarele caracteristici în funcție de genul bacterian căruia îi aparțin:

- *E. coli* crește sub forma unor colonii albastre sau roz;
- *Klebsiella spp.* crește sub forma unor colonii verzi;
- *Proteus spp*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.* cresc sub forma unor colonii maro.

Mediul cromogen Oxoid Brilliance ESBL conține cefpodoxim, o cefalosporină de generația a III-a la care toate tulpinile de producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins sunt rezistente (Huang ș.a., 2010; www.oxoid.com).

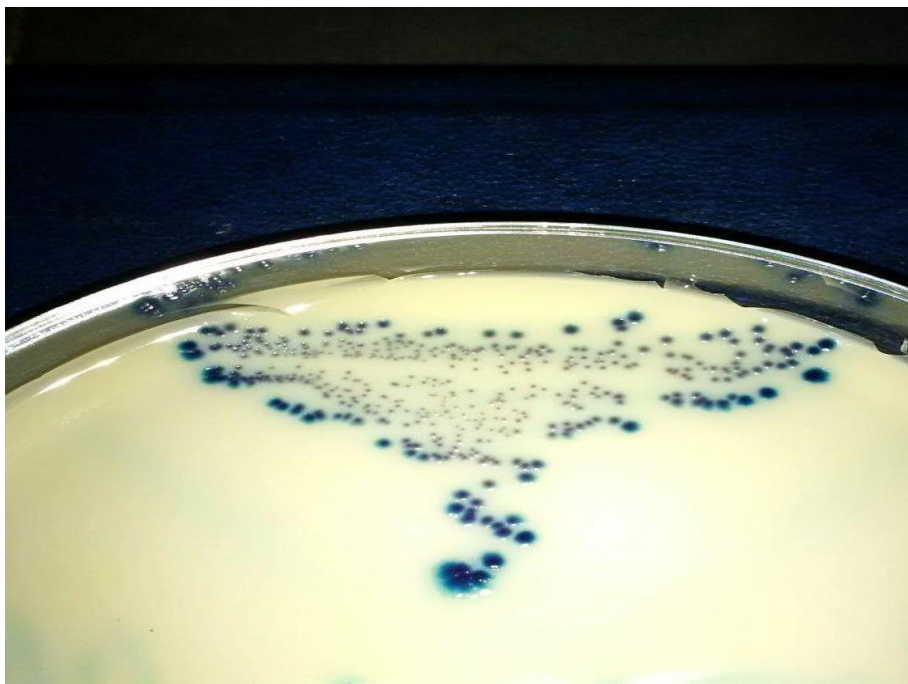


Fig.4.1. Colonii de *E.coli* pe mediul Brilliance ESBL Oxoid (foto original)

Fig.4.1. *E.coli* on Brilliance ESBL Oxoid medium (original photo)

4.3. Identificarea tulpinilor de enterobacterii obținute în urma screening-ului ESBL

Încadrarea taxonomică a tulpinilor obținute în urma screening-ului ESBL, precum și caracterizarea lor din punct de vedere molecular s-a realizat în cadrul Laboratorului de Microbiologie al Institutului de Medicină Veterinară, din cadrul Universității din Liverpool.

Stabilirea speciilor bacteriene izolate în etapa de screening a fost realizată prin tehnica PCR pe baza identificării genelor *bla_{uspA}* și *bla_{uidA}* pentru tulpinile de *E.coli*, iar pentru identificarea altor enterobacterii izolate s-au utilizat testele biochimice minime pe mediile Mobility-Urease-Indol (MIU) și Triple Sugar Iron (TSI) (Oxoid, Basingstoke, UK).

Pentru pregătirea tulpinilor bacteriene pentru reacția PCR acestea au fost inoculate pe mediul agar cu sânge și incubate la 37°C timp de 24h. Aceasta etapă a fost una necesară pentru extracția ADN-ului bacterian ce s-a realizat prin metoda „boiled preps”. Pentru aceasta, s-a preluat o colonie bacteriană de 24h cu care s-a realizat o suspensie de 1ml apă distilată sterilă și o colonie bacteriană,

amestecul astfel obținut fiind pus pe o baie de apă timp de 10 minute la 95°C. Ulterior acestei etape, suspensia a fost centrifugată timp de 3 minute la 10000 de rotații pe minut, iar la final au fost extrași 0,5ml din supernatantul obținut prin centrifugare, s-a transferat într-un tub Eppendorf și s-a folosit ca și „template” pentru reacțiile PCR.

Gena *bla_{uspA}* codifică proteina de stres universal și este specifică tulpinilor de *E.coli* (Chen ș.a.,1998). Secvențele de nucleotide ce alcătuiesc gena *bla_{uidA}* codifică β-D glucuronidaza (GUD), o enzimă prezentă la 94-97% din tulpinile non-patogene de *E.coli* (Manafi ș.a.,1991; Frampton ș.a., 1993).

Protocolul de lucru și designul primerilor a fost cel recomandat de Anastasi și col. pentru gena *bla_{uspA}*, iar pentru gena *bla_{uidA}* cel recomandat de Mc.Daniels și colaboratorii (McDaniels ș.a.,1996; Anastasi E.M. ș.a.,2010) (Tabel 4.2. și 4.3.).

Tabel 4.2. / Table 4.2.

**Secvențele primerilor și temperaturile de aliniere utilizate în reacția PCR
pentru încadrarea taxonomică a tulpinilor izolate**
**Primer design and alignment temperatures used in PCR for taxonomic
classification of isolated strains**

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungi mea (bp)	Tempera tura de aliniere	Referințe
uspA	Fw: 5'-CCGATACGCTGCCAATCA GT-3' Rev:5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3'	884	56°C	Anastasi ș.a.,2010
uidA	Fw: 5'-CCAAAAGCCAGACAGAGT-3' Rev: 5'-GCACAGCACATCCCCAA AGAG- 3'	623	58°C	McDaniels ș.a.,1996

PCR-ul pentru identificare a fost realizat cu T100 Termal Cycler Bio-Rad. Tehnica s-a realizat conform etapelor descrise la subsubcapitolul 2.2.1, respectând condițiile de temperatură și timp recomandate pentru fiecare genă analizată.

Rezultatele din reacția PCR au fost citite prin electroforeză în gel de acrilamidă 1%, migrarea având loc 60 minute.

Tulpinile bacteriene la care genele *bla_{uidA}* și *bla_{uspA}* nu au fost identificate (deci nu au fost confirmate molecular ca aparținând speciei *E.coli*), au fost confirmate ca fiind enterobacterii și încadrate taxonomic pe baza caracterelor biochimice minime utilizând testele TSI și MIU.

Tabelul 4.3. / Table 4.3.

Condițiile de amplificare prin tehnica PCR pentru identificarea speciei *E.coli*
PCR amplification conditions for identification of *E.coli*

Gena	Condițiile	Referințe
uspA	94°C- 4 minute 94°C- 30 secunde 56°C- 30 secunde 72°C- 30 secunde 72°C- 5minute  X30	Anastasi ș.a.,2010
uidA	94°C- 4 minute 94°C- 30 secunde 58°C- 30 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 7 minute  X30	McDaniels ș.a.,1996

4.4.Confirmarea fenotipică a tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL

În urma screening-ului probelor de fecale, izolatele care au produs colonii caracteristice pe mediul Brilliance ESBL Oxoid, au fost considerate tulpini bacteriene prezumtiv producătoare de ESBL. Confirmarea fenotipică a acestora s-a realizat prin metoda discurilor combinate, metoda recomandată de standardul CLSI (CLSI, 2014).

Pentru aceasta, coloniile obținute inițial pe mediul Brilliance ESBL Oxoid au fost transplantate și cultivate pe mediul agar cu sânge (Blood Agar Oxoid). Pentru fiecare izolat, s-a realizat o diluție a cărei turbiditate a corespuns cu turbiditatea 0,5McFarland. Plăci cu mediul Müller Hinton au fost însămânțate prin ștergere cu diluția obținută. Antibioticele utilizate au cuprins: cefpodoxim (10μg), cefpodoxim/acid clavulanic (10/1μg), cefotaxim (30μg), cefotaxim/acid clavulanic (30/10μg), ceftazidim (30μg) și ceftazidim/acid clavulanic (30/10μg) amplasate la distanțe de 25-30mm între ele. Rezultatul a fost citit după 24h și interpretarea s-a realizat conform standardului CLSI: au fost considerate izolate cu fenotip ESBL toate tulpinile a căror diferență de diametru dintre cefalosporina simplă și cefalosporina potențată cu acid clavulanic a fost $\geq 5\text{mm}$ (fig.4.2.).

Tulpinile ce nu au fost confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL, dar care au crescut pe mediul utilizat pentru screening au fost păstrate în vederea analizei lor moleculare.

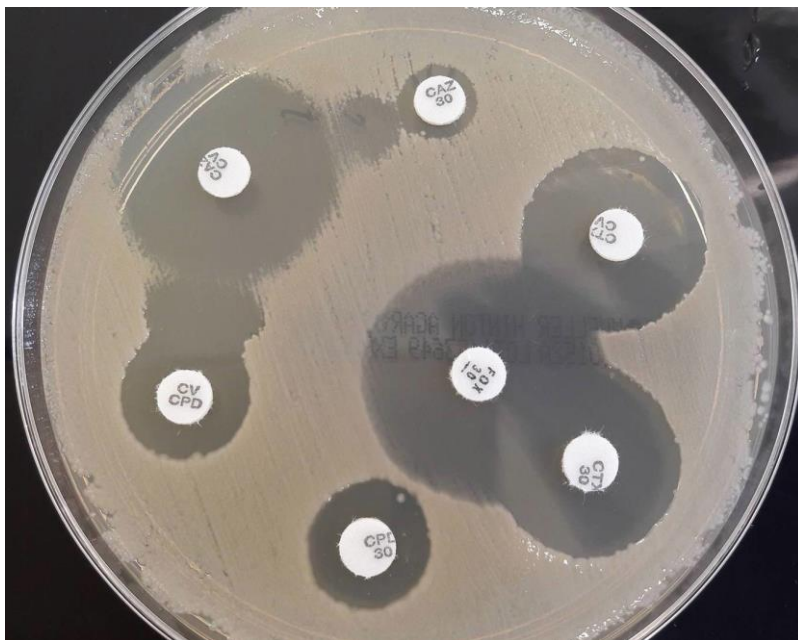


Fig.4.2. Metoda discurilor combinate (foto original)

Fig.4.2. Combined Disc Method (Original Photo)

4.5. Caracterizarea fenotipului de rezistență a tulpinilor producătoare de ESBL la alte clase de antibiotice

Pentru caracterizarea privind sensibilitatea tulpinilor analizate la alte clase de antibiotice au fost selectate doar tulpinile care au fost confirmate fenotipic prin metoda discurilor combinate ca fiind ESBL.

Testarea sensibilității și la alte antibiotice a fost realizată prin metoda difuzimetrică sau Kirby Bauer. Pentru fiecare tulpină bacteriană s-au realizat diluții a căror turbiditate a corespuns cu turbiditatea 0,5McFarland. Însămânțarea plăcilor cu mediul Müller Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) s-a realizat prin ștergere. Antibioticele alese au fost selectate după criteriul încadrării izolatelor în categoria MDR și sunt redate în tabelul 4.4. (Magiorakos ș.a.,2012) (tabelul 4.4.; fig.4.3.). Incubarea a fost realizată la 37°C timp de 24h.

Tabelul 4.4. / Table 4.4.

**Antibioticele utilizate pentru testarea sensibilității la alte clase
antimicrobiene**
Antibiotics used to test susceptibility to other antimicrobial classes

Antibiotic	Categoria antimicrobiană	Diametrele pentru interpretarea rezultatelor (mm)		
Gentamicină (10μg)	Aminoglicozide	S: ≥ 16 ;	I: 13-15 ;	R: ≤ 12
Imipenem (10μg)	Carbapeneme	S: ≤ 23 ;	I: 20-22;	R: ≤ 19
Enrofloxacin (5μg)	Fluorochinolone	S: ≥ 23 ;	I: 17-22;	R: ≤ 16
Trimethoprim+ sulfometoxazol		S: ≥ 16 ;	I: 11-15;	R: ≤ 10
Aztreonam (30μg)	Monobactami	S: ≥ 21 ;	I: 18-20;	R: ≤ 17
Ampicilină (10μg)	Peniciline	S: ≥ 17 ;	I: 14-16;	R: ≤ 13
Amoxicilină/acid clavulanic (30μg)	Peniciline+inhibitori beta-lactamaze	S: ≥ 18 ;	I: 14-17;	R: ≤ 13
Cloramfenicol (30μg)	Fenicoli	S: ≥ 18 ;	I: 13-17;	R: ≤ 12
Tetraciclină (30μg)	Tetraciclina	S: ≥ 15 ;	I: 12-14;	R: ≤ 11

S: sensibil; I: intermediar; R: rezistent



Fig. 4.3. Antibiogramă realizată în vederea încadrării tulpinilor ESBL în categoria MDR
Fig. 4.3. Susceptibility test for ESBL strains to be categorized as MDR (original photo)

4.6. Rezultate și discuții

4.6.1. Rezultate și discuții aferente screening-ului ESBL

Au fost recoltate și supuse screening-ului pe mediul Brilliance ESBL Oxoid 279 de probe de materii fecale atât de origine animală cât și de origine umană. Majoritatea probelor animale au fost recoltate de la câini ($n=175$), urmate de cele de la pisici ($n=37$), și cai ($n=16$), în timp ce probele umane au provenit de la proprietari ($n=42$) și personal sanitar veterinar ($n=9$) (tabelul 4.1.)

Din totalul de probe analizate, 117/279 (41,93%) probe de origine umană și animală au fost pozitive și considerate prezumtiv ESBL. Pe baza acestor rezultate s-a determinat prevalența tulpinilor de enterobacterii prezumtiv producătoare de ESBL în funcție de proveniența izolatelor, după cum urmează:

- 81/228 (35,53%) de tulpini prezumtiv ESBL au fost izolate din materiile fecale recoltate de la animale (39,5% de la animalele de la padocuri și 60,5% de la cele de la cabinete veterinare);
- 36/51 (70,58%) de tulpini prezumtiv ESBL au fost izolate de la proprietari/personal sanitar veterinar.
- de la caii analizați nu au fost izolate tulpini prezumtiv ESBL.

Graficele din figurile 4.4. și 4.5. sintetizează rezultatele obținute în urma screening-ului ESBL atât din punct de vedere al numărului total de tulpini prezumtiv ESBL obținute dar și din punct de vedere al provenienței probelor analizate.

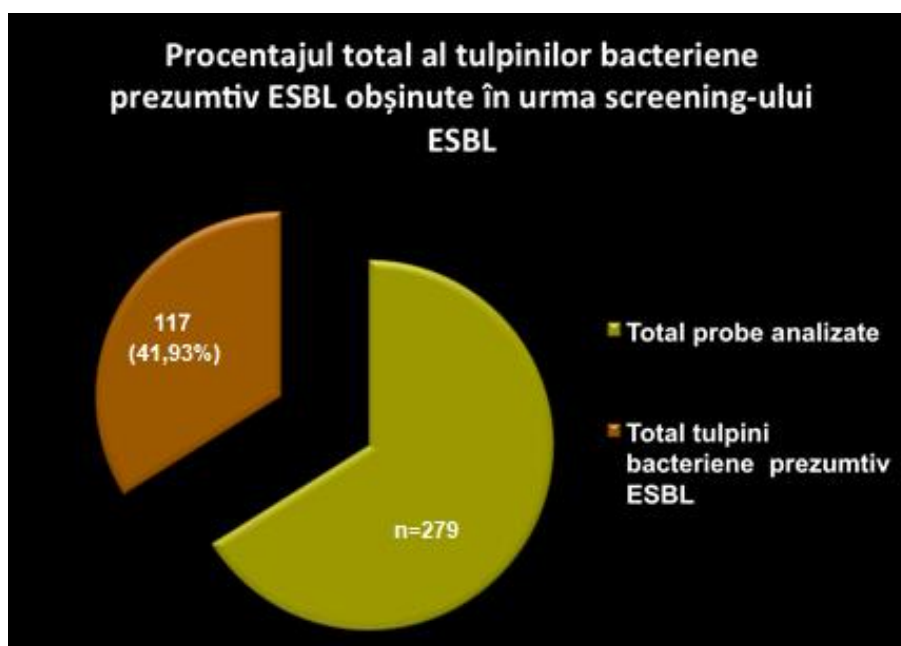


Fig.4.4. Procentajul enterobacteriilor prezumtiv producătoare de ESBL din totalul de probe analizate
Fig.4.4. Percentage of ESBL presumptive from the total of analyzed samples

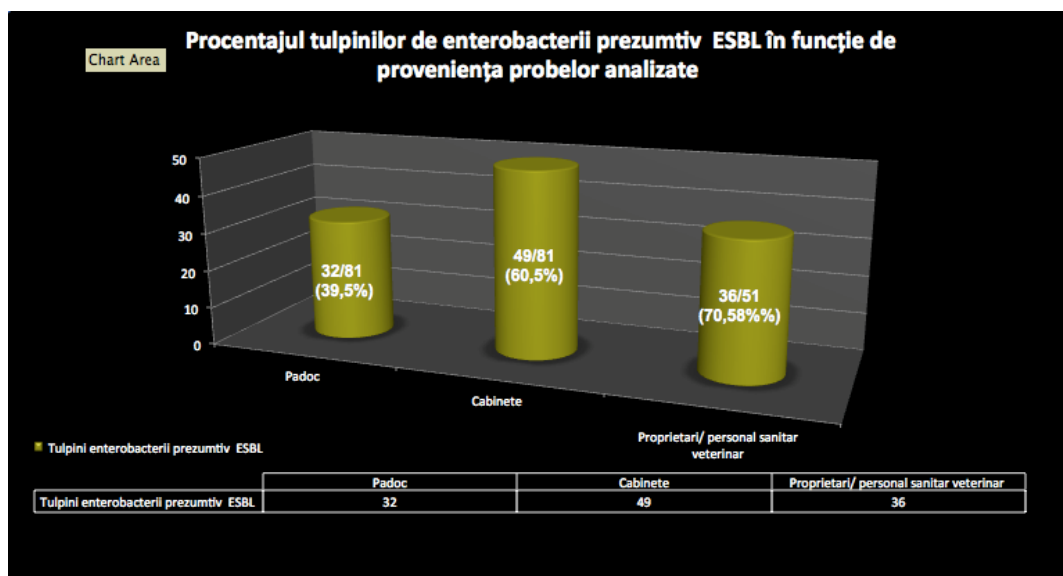


Fig.4.5. Procentajul enterobacteriilor prezumtiv producătoare de ESBL raportat la proveniența probelor analizate

Fig.4.5. Percentage of ESBL presumptive versus provenance of analyzed samples

În ultima perioada caii sunt utilizați ca animalele de agrement, iar prin prisma contactului direct cu oamenii pot fi considerați animale de companie. Literatura de specialitate menționează o prevalență ridicată a tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL. Rezultatul negativ obținut în acest studiu, nu infirma lipsa purtătorilor ESBL ci considerăm că numărul mic de probe și arealul geografic restrâns analizat precum și istoricul în consumul de antibiotice al acestor animale limitează rezultatele obținute de noi (Dierikx ș.a.,2012; Johns ș.a., 2012; Scmiedel ș.a.,2014).

4.6.2. Rezultate și discuții privind încadrarea taxonomică a tulpinilor de enterobacterii izolate

Încadrarea taxonomică a tulpinilor de enterobacterii izolate în urma screening-ului ESBL s-a realizat identificând genele *bla_{uspA}* și *bla_{uidA}* pentru identificarea tulpinilor de *E.coli*, iar pentru celelalte enterobacterii (*Klebsiella spp.* și *Proteus spp.*) identificarea s-a realizat pe baza caracterelor biochimice minime utilizând medii politrope (MIU, TSI).

Au fost supuse testelor moleculare cele 117 tulpini prezumtiv ESBL (81 de origine animală și 36 de origine umană).

Din totalul de 81 de tulpini de origine animală prezumtiv ESBL, 67/81 (82,71%) au fost pozitive pentru gena *bla_{uspA}* și 3/81 (3,7%) pentru gena *bla_{uidA}*, prin urmare 70/81 (86,41%) din tulpinile analizate aparțin speciei *E.coli*.

Restul tulpinilor bacteriene care nu au fost identificate ca fiind *E.coli*, au aparținut genului *Proteus* (7,4%) și speciei *Klebsiella pneumoniae* (6,19%).

Diferențierea dintre tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* și *Klebsiella oxytoca* s-a realizat analizând capacitatea de producere a indolului din triptofan a celor două specii bacteriene, prima fiind indol negativă, iar *Klebsiella oxytoca* indol pozitivă (Maslow ș.a., 1993)

În grupul tulpinilor de origine umană au fost analizate molecular 36 de tulpini. Pentru 29/36 (80,55%) de tulpini a fost identificată gena *bla_{uspA}*, iar 5/36 (13,88%) au fost pozitive pentru gena *bla_{uidA}*, ceea ce înseamnă că 34/36 (94,4%) dintre tulpinile bacteriene analizate aparțin speciei *E.coli*. Restul tulpinilor, 2/36 (5,6%) au aparținut speciei *Klebsiella pneumoniae*. Ca și în cazul tulpinilor de origine animală, diferențierea între speciile de *Klebsiella pneumoniae* și *Klebsiella oxytoca* s-a realizat pe baza producției de indol.

Numărul de tulpini de enterobacterii identificate molecular sau biochimic este redat schematic în figura 4.6.

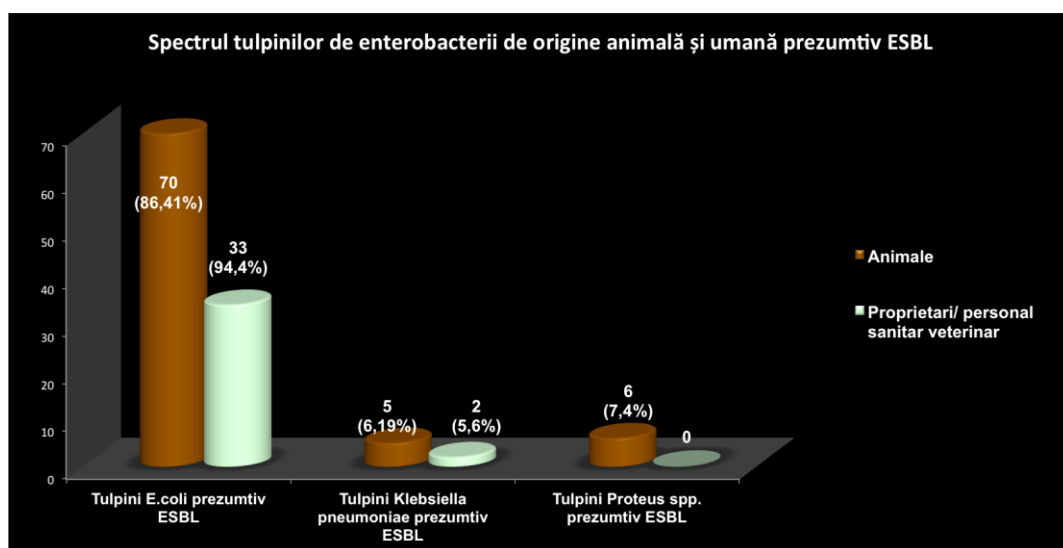


Fig.4.6. Spectrul enterobacteriilor obținute în urma screening-ului ESBL

Fig.4.6. Spectrum of enterobacteria obtained from ESBL screening

4.6.3. Rezultate și discuții privind confirmarea fenotipică a tulpinilor producătoare de ESBL de origine animală și umană.

Confirmarea fenotipică a izolatelor prezumtiv ESBL s-a realizat prin metoda discurilor combinate, descrisă la subcapitolul 4.4.

Din cele 117 izolate analizate, 63 (53,84%) au fost confirmate fenotipic prin metoda discurilor combinate ca fiind ESBL (fig.4.7.). Rezultatul negativ obținut pentru tulpinile bacteriene (46,16%) care nu au fost confirmate fenotipic ca fiind producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins, deși au crescut pe mediul utilizat nu infirmă prezența moleculară a acestor enzime în cadrul izolatelor analizate. Uneori, producției de enzime AmpC și ESBL în cadrul aceleiași tulpini

sau existența mai multor mecanisme de rezistență în cadrul aceleași tulpini bacteriene îngreunează diagnosticul fenotipic și se pot obține rezultate fals negative. Confirmarea de certitudine a prezenței sau absenței enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins în cadrul unei tulpini bacteriene este dată doar de caracterizarea moleculară a genelor ce codifică aceste enzime. Prin urmare, toate cele 117 tulpini ce au fost obținute în urma screening-ului ESBL au fost supuse testelor de biologie moleculară în vederea identificării celor mai frecvente enzime beta-lactamaze cu spectru extins: CTX-M, TEM, SHV, OXA.

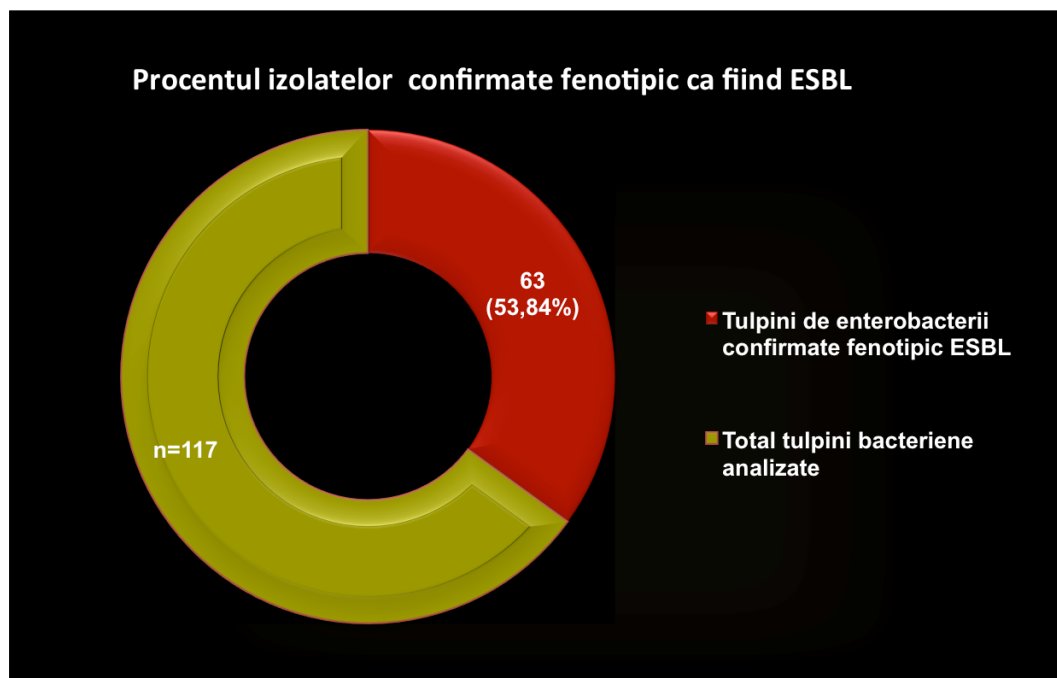


Fig. 4.7. Procentul tulpinilor bacteriene confirmate fenotipic ESBL
 Fig. 4.7. Percentage of bacterial strains confirmed phenotypically ESBL

4.6.4. Rezultate și discuții privind caracterizarea fenotipului de rezistență al tulpinilor producătoare de ESBL la alte clase de antibiotice.

Investigațiile pentru stabilirea gradului de rezistență la alte clase de antibiotice au fost realizate doar pentru tulpinile care au fost confirmate fenotipic prin metoda discurilor combinate ca fiind ESBL (63 de tulpini: 42 de origine animală și 21 de origine umană).

Rezultatele obținute pentru tulpinile izolate de la animale sunt prezentate în tabelul 4.5., iar pentru tulpinile de origine umană în tabelul 4.6.

Tabelul 4.5. / Table 4.5.

Fenotipurile de rezistență identificate la tulpinile bacteriene de origine animală
Resistance phenotypes identified in bacterial strains isolated from animals

Sursa	Nr.izolate cu același profil de rezistență	Nr. antibioticelor la care s-a observat rezistență	Fenotip de rezistență
Animale de companie	1	2	AMP-AMC
	1	3	AMP-ENR-TE
	7		AMP-AMC-ATM
	2	4	AMP-AMC-ENR-TE
	2		AMP-AMC-ATM-TE
	1		AMP-AMC-CN-ATM
	1		AMP-AMC-SXT-ATM
	1		AMP-ENR-SXT-ATM
	1		AMP-CN-ATM-TE
	2	5	AMP-AMC-C-SXT-TE
	1		AMP-AMC-C-ATM-TE
	1		AMP-AMC-CN-ENR-TE
	1		AMP-AMC-ENR-ATM-TE
	1		AMP-AMC-ENR-SXT-ATM
	4	6	AMP-AMC-C-SXT-ATM-TE
	4		AMP-AMC-ENR-SXT-ATM-TE
	1		AMP-C-ENR-SXT-ATM-TE
	3		AMP-AMC-C-CN-ENR-SXT
	1		AMP-AMC-C-SXT-ATM-TE
	2	7	AMP-AMC-C-CN-ENR-SXT-ATM
	1		AMP-AMC-CN-ENR-SXT-ATM-TE
	1		AMP-AMC-C-CN-ENR-SXT-TE

Tabelul 4.6. / Table 4.6.

Fenotipurile de rezistență identificate la tulpinile bacteriene de origine umană
Resistance phenotypes identified in bacterial strains isolated from humans

Sursa	Nr.izolate cu același profil de rezistență	Nr. antibioticelor la care s-a observat rezistență	Fenotip de rezistență
Proprietari/personal sanitar veterinar	1	2	AMP-CN
	1	3	AMP-ENR-TE
	1		AMP-AMC-ATM
	1	4	AMP-AMC-ATM-TE
	1		AMP-ENR-SXT-TE
	1	5	AMP-C-ENR-ATM-TE
	1		AMP-C-ENR-SXT-TE
	1		AMP-ENR-SXT-ATM-TE
	1		AMP-AMC-ENR-SXT-TE
	3		AMP-C-CN-ENR-SXT
	1		AMP-C-SXT-ATM-TE
	1	6	AMP-AMC-C-ENR-ATM-TE
	1		AMP-C-CN-ENR-ATM-TE
	1		AMP-C-CN-ENR-SXT-TE
	2		AMP-CN-ENR-SXT-ATM-TE
	1	7	AMP-AMC-C-CN-ENR-ATM-TE
	1		AMP-AMC-CN-ENR-SXT-ATM-TE

Conform Magiorakos și col. o tulpină bacteriană ce prezintă rezistență la antibioticele din cel puțin 3 clase diferite de antibiotice este considerată ca având rezistență multiplă (MDR) (Magiorakos ș.a, 2012). Conform rezultatelor prezentate în tabelele 4.5. și 4.6., acest studiu a identificat o prevalență ridicată a tulpinilor bacteriene cu rezistență multiplă. Din totalul de 42 de tulpini de origine animală confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL, 39 (92,85%) pot fi încadrate în categoria MDR.

De asemeni pentru tulpinile de origine umană, din totalul de 21 de izolate confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL, 19 (90,47%) au prezentat rezistență multiplă la antibiotice.

În urma investigațiilor realizate cu scopul de a stabili gradul de rezistență la alte clase de antibiotice pentru tulpinile confirmate fenotipic ca producătoare de ESBL, s-a observat că nivelul de rezistență pentru izolate de origine animală este crescut pentru antibioticele din clasele: beta-lactamine (100% rezistență la ampicilină, 85,71% la amoxicilină/acid clavulanic și 73,81% aztreonam), sulfonamide (54,76% rezistență la sulfamethoxazole/trimethoprim), fluoroquinolone (45,23% la enrofloxacin), tetraciline (54,76% rezistență la tetraciclina) (fig.4.8.).

Pentru izolatele de origine umană, un grad ridicat de rezistență s-a înregistrat pentru antibioticele din clasele după cum urmează: beta-lactamine (95,24% rezistență la ampicilină și 52,38% la aztreonam), fluoroquinolone (76,19% rezistență la enrofloxacin), sulfonamide (57,14% rezistență la sulfamethoxazole/trimethoprim), tetraciline (71,43% la tetraciclina), fenicoli (47,62% rezistență la cloramfenicol) și aminoglicozide (47,62% rezistență la gentamicină) (fig.4.9.).

Rezultatele obținute de noi sunt în concordanță cu literatura de specialitate, mai mult decât atât ele sunt coroborate de statisticile privind clasele de antibiotice ce sunt utilizate cel mai frecvent în România atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară (Măciucă, 2014). Conform raportului ECDC (European Center for Diseases Prevention and Control) și CDDEP (Center for Disease Dynamics, Economics and Policy), consumul de antibiotice în România, în anul 2015 era crescut pentru antibioticele din clasele beta-lactamine, chinolone, sulfonamide și aminoglicozide (CDDEP, 2015; ECDC, 2015). Pentru clasele de antibiotice cele mai uzitate în medicina veterinară, European Medicines Agency preciza în anul 2016 că există un nivel ridicat de consum pentru antibioticele din clasele tetraciline, beta-lactamine, sulfonamide și aminoglicozide (European Medicine Agency, 2016).

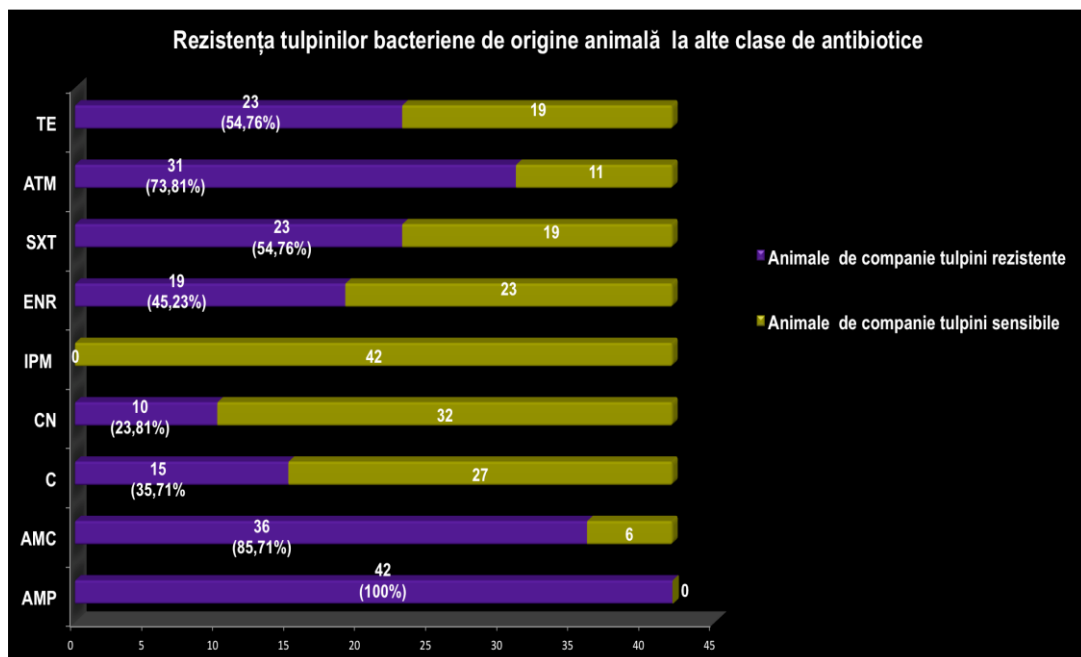


Fig.4.8. Rezistența izolatelor de origine animală la alte clase de antibiotice
 Fig.4.8. Resistance of strains isolated from animal to other classes of antibiotics

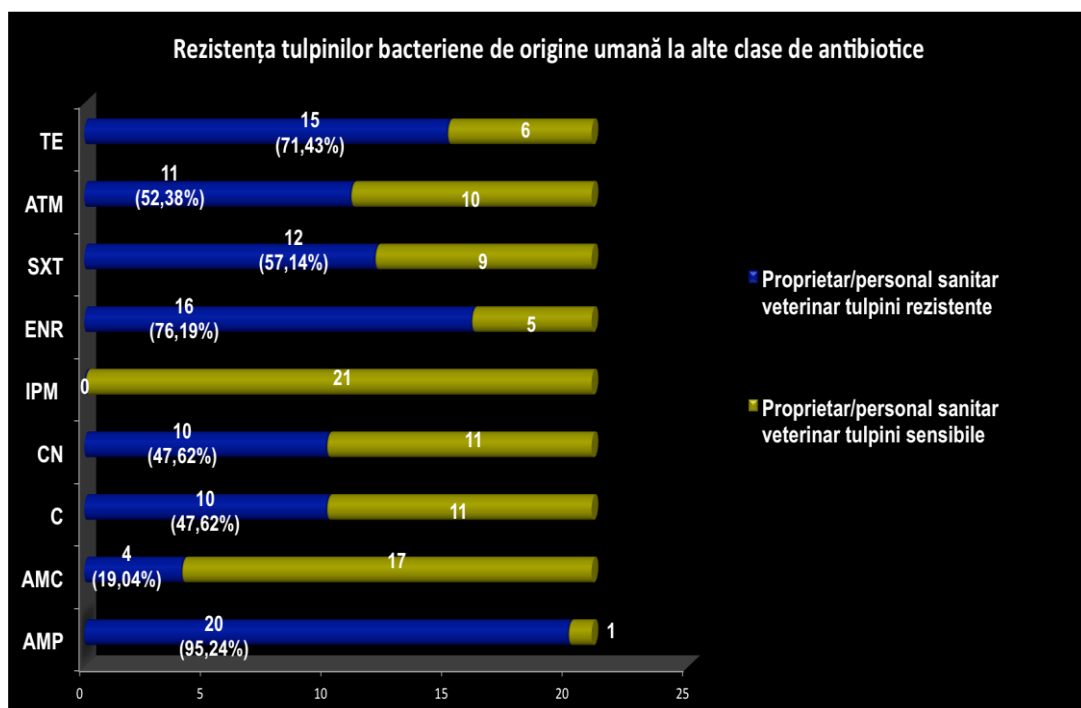


Fig.4.9. Procentul de rezistență al tulpinilor de origine umană la alte clase de antibiotice
 Fig.4.9. Resistance of strains isolated from human to other classes of antibiotics

4.7.Concluzii parțiale

1. Au fost recoltate și prelucrate 279 probe de materii fecale, din care 228 au provenit de la animale de companie și 51 de la proprietari sau personal sanitar veterinar.

2. În urma screening-ului ESBL au fost izolate 117/279 (41,93%) tulpini de enterobacterii prezumtiv ESBL. Din acestea, 81/228 (35,53%) de tulpini au fost izolate de la animale și 36/51 (70,58%) de la proprietari sau personalul sanitar veterinar.

3. În urma screening-ului nu au fost izolate tulpini de enterobacterii producătoare de ESBL din materiile fecale ale cailor luați în studiu.

4. Din totalul de 117 tulpini prezumtiv ESBL, 104 (88,89%) au aparținut speciei *E.coli*, 7 (5,98%) au fost identificate ca fiind *Klebsiella pneumoniae* și 6 (5,13%) ca aparținând speciei *Proteus spp.*

5. Confirmarea fenotipică a tulpinilor izolate în urma screening-ului ESBL s-a realizat prin metoda discurilor combinate și din totalul de 117 izolate, 63 (53,84%) au fost confirmate fenotipic ca fiind ESBL.

6. Tulpinile care nu au fost confirmate fenotipic, pot prezenta simultan mai multe mecanisme de rezistență ce maschează fenotipic substratul ESBL. Din aceste considerente toate tulpinile izolate în urma screening-ului ESBL vor fi testate în vederea caracterizării substratului molecular privind rezistența la antibiotice.

7. Investigațiile privind rezistența la alte clase de antibiotice a izolatelor confirmate fenotipic ca fiind ESBL, au pus în evidență un grad ridicat de rezistență multiplă la antibiotice (92,85% pentru tulpinile de origine animală și 90,47% pentru izolatele de origine umană).

8. Toate cele 63 de tulpini testate pentru rezistența la alte clase de antibiotice au fost sensibile la imipenem.

CAPITOLUL V. IDENTIFICAREA PRINCIPALELOR GENE IMPLICATE ÎN APARIȚIA ȘI TRANSMITEREA REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICELE BETA-LACTAMICE

CHAPTER V. DETECTION OF THE MAIN GENES INVOLVED IN THE EMERGENCE AND TRANSMISSION OF RESISTANCE TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS

Antibioticele din clasa beta-lactamine sunt unele dintre cele mai utilizate substanțe antimicrobiene atât în tratamentul bolilor infecțioase bacteriene umane cât și veterinare. Utilizarea irațională și abuzivă a acestora a dus la apariția și răspândirea pe scară largă a rezistenței la această clasă de antimicrobiene.

În acest capitol este descrisă caracterizarea moleculară a tulpinilor bacteriene obținute în urma screening-ului ESBL în vederea identificării principalelor gene ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, a genelor AmpC beta-lactamaze, precum și a genelor ce determină rezistența la clasa de antibiotice fluoroquinolone și la colistin. De asemenea sunt descrise metodele utilizate pentru identificarea principalelor plasmide care sunt implicate în mecanismele de transmitere a genelor de rezistență.

Caracterizarea moleculară a tulpinilor, ca și încadrarea taxonomică a fost realizată în cadrul Laboratorului de Microbiologie al Institutului de Medicină Veterinară de la Universitatea din Liverpool, Marea Britanie.

5.1. Material și metodă

5.1.1 Identificarea principalelor gene ce codifică producția enzimelor ESBL

Investigațiile moleculare pentru identificarea substratului genetic al fenotipului ESBL s-au axat pe identificarea principalelor gene de rezistență: *bla*_{CTXM}, *bla*_{TEM} și *bla*_{SHV}. Pentru genotipul CTX-M s-a urmărit identificarea celor 5 grupuri de gene ce codifică enzimele din această categorie: *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-8} și *bla*_{CTX-M-25}. De asemenea protocolul de lucru a urmărit și identificarea genelor *bla*_{OXA} ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins.

Etapa preliminară realizată pentru extracția ADN-ului bacterian prin tehnica „boiled preps” a presupus cultivarea tulpinilor izolate pe mediul agar cu sânge. Colonii bacteriene de 24h au fost suspendate într-un mililitru de apă distilată sterilă, menținute 10 minute pe o baie de apă la 95°C și centrifugate apoi

3 minute la 10.000 de rotații pe minut. După centrifugare s-a extras câte 0,5ml supernatant pentru fiecare tulpină bacteriană.

Markerii de rezistență au fost identificați prin tehnica PCR respectând condițiile de lucru pentru fiecare genă. Designul primerilor utilizați precum și temperaturile specifice pentru fiecare etapă sunt redate schematic în tabelul 5.1 și 5.2.

Pentru genele *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{OXA} identificarea s-a realizat prin PCR multiplex, iar rezultatele obținute au fost confirmate ulterior prin PCR simplex, pentru fiecare marker de rezistență utilizându-se aceleași primeri și aceleași condiții ca și în cazul PCR-ului multiplex..

Ampliconii obținuți în urma reacției PCR au fost identificați prin electroforeză.

Tabelul 5.1. / Table 5.1.

Condițiile de amplificarea prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins
PCR amplification conditions for identification of genes encoding extended-spectrum beta-lactamase enzymes

Gena	Condițiile	Referințe
CTX-MU	94°C- 3 minute 94°C- 60 secunde 58°C- 60 secunde 72°C- 60 secunde 72°C- 5minute  X30	Wedley ș.a., 2011
CTX-M1	94°C- 3 minute	Wedley ș.a., 2011
CTX-M-2	94°C- 60 secunde	
CTX-M-9	58°C- 60 secunde 72°C- 60 secunde 72°C- 7 minute	
CTX-M-8	94°C- 5 minute	
CTX-M-25	94°C- 25 secunde 52°C- 40 secunde 72°C- 50 secunde 72°C- 6 minute  X30	Wedley ș.a., 2011
Multiplex TEM/SHV/OXA	94°C- 10 minute 94°C- 40 secunde 60°C- 40 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 7 minute  X30	Dallenne ș.a.,2010

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele ESBL
Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding ESBL enzymes

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
CTX-MU	CTX-MU1: ATGTGCAGYACCAAGTAARGTKATGGC	593	58°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-MU2: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAACAGCGG			
CTX-M-1	CTX-M-1F: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAACAGCGG	876	58°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-M-1R: AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT			
CTX-M-2	CTX-M-2F: CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	893	58°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-M-2R : CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG			
CTX-M-9	CTX-M-9F: CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	876	58°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-M-9-R : ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC			
CTX-M-8	CTX-M-8F: TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC 666	666	52°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-M-8/25R: AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
CTX-M-25	CTX-M-25F: GCA CGA TGA CAT TCG GG	327	52°C	Wedley ș.a., 2011
	CTX-M-8/25R : AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
Multiplex TEM/SHV/OXA	MultiTSO-T_for: CATTCCGGTGTGCCCCATTTC	800	60°C	Dallenne ș.a.,2010
	MultiTSO-T_rev: CGTTCATCCATAGTTGCCCTGAC			
	MultiTSO-S_for: AGCCGCTTGAGCAAAATTAAAC			
	MultiTSO-S_rev: ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
	MultiTSO-O_for: GGCACCAGATTCAACTTCAAG			
	MultiTSO-O_rev: GACCCCAAGTTTCCCTGTAAGTG	564		

Existența în cadrul aceleiași tulpini bacteriene a genelor codante ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, dar și a genelor ce codifică enzimele de tip AmpC beta-lactamaze îngreunează confirmarea fenotipică a tulpinilor producătoare de ESBL ducând la apariția rezultatelor fals negative.

Genele AmpC beta-lactamaze codificate plasmidic au fost cunoscute din anul 1989, la puțin timp după cele mediate cromozomial, fiind identificate la enterobacterii izolate din infecții nosocomiale sau non-nosocomiale (Philippon ș.a., 2002; Walther-Rasmussen ș.a., 2002). Enzimele AmpC beta-lactamaze conferă tulpinilor bacteriene purtătoare rezistență la o gamă largă de antibiotice betalactamice, inclusiv peniciline, oximinocefalosporine, cefamicine, cefalosporine potențate cu inhibitori beta-lactamici și variabil la aztreonam. De asemenea sensibilitatea la cefalosporine de generația a patra (cefepim, cefpirom) și carbapeneme este scăzută (Jacoby, 2009). Dintre toate genele ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze, gena *bla_{CMY-2}* este cea mai răspândită (Jacoby, 2009).

Identificarea moleculară a genelor AmpC beta-lactamaze la tulpinile analizate s-a realizat tot prin tehnica PCR multiplex, iar ulterior rezultatele pozitive au fost confirmate prin PCR simplex. Primeri specifici utilizați pentru identificarea celor 6 gene ce codifică enzimele AmpC și temperaturile utilizate pentru fiecare etapă PCR sunt descrise în tabelele 5.3. și 5.4. Rezultatul PCR-ului a fost identificat prin electroforeză.

Tabelul 5.3. / Table 5.3.

Condițiile de amplificarea prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze
PCR amplification conditions for identification of genes encoding AmpC beta-lactamase enzymes

Gena	Condițiile	Referințe
MOX-M	94°C- 3 minute 94°C- 30 secunde 64°C- 30 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 7 minute  X25	Kao ș.a., 2010
CIT-M		
DHA-M		
ACC-M		
EBC-M		
FOX-M		

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele AmpC β-lactamaze

Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding AmpC β-lactamase enzymes

Tabel 5.4. / Table 5.4.

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Genele vizate	Referințe
MOX-M	Fw: 5'-GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT-3' Rev: 5'-CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C-3'	520	64°C	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8, CMY-9, CMY-10, CMY-11	Kao ș.a.,2010
CIT-M	Fw: 5'-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3' Rev: 5'-TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3'	462	64°C	LAT-1, LAT-2, LAT-3, LAT-4, CMY-2, CMY-3, CMY-4, CMY-5, CMY6, CMY-7, BIL-1	Kao ș.a.,2010
DHA-M	Fw:5'-AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T-3' Rev: 5'-CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC-3'	405	64°C	DHA-1, DHA-2	Kao ș.a.,2010
ACC-M	Fw: 5'-AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA-3' Rev: 5'-TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC-3'	346	64°C	ACC	Kao ș.a.,2010
EBC-M	Fw: 5'-TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG-3' Rev: 5'-CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT-3'	302	64°C	MIR-1T, ACT-1	Kao ș.a.,2010
FOX-M	Fw: 5'-AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G-3' Rev: 5'-CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG-3'	190	64°C	FOX-1; FOX-5b	Kao ș.a.,2010

5.1.2 Identificarea principalelor gene ce codifică rezistența la fluoroquinolone și colistin

Antibioticele din clasele beta-lactamine și fluoroquinolone sunt cele mai uzitate în terapia bolilor infecțioase determinate de tulpini bacteriene de origine umană și veterinară. Elemente genetice mobile cum ar fi plasmidele implicate în mecanismul de transmitere a enzimelor de tip ESBL pot transmite simultan și markerii ce determină rezistența la celelalte clase de antibiotice amintite anterior (Eftekhari ș.a.,2015).

Tulpinile analizate în acest studiu pentru portajul fecal ESBL provin nu doar de la câini din padocuri ci și de la animalele de companie ce prezentau un istoric medical în tratamentul cu antibiotice din clasele beta-lactamine și fluoroquinolone. În acest subcapitol este descris screening-ul markerilor de rezistență și pentru alte grupe de antibiotice în vederea realizării unei hărți moleculare cât mai complexă a tulpinilor analizate în acest studiu.

De asemenea rezistența la colistin este un subiect de interes actual datorită descoperirii recente a genelor ce codifică rezistența la colistin (*mcr-1* și *mcr-2*) amplasate pe plasmide (Liu ș.a.,2016).

Extracția ADN-ului bacterian s-a realizat în maniera descrisă la subcapitolele anterioare, iar identificarea genelor de rezistență: *bla_{QnrA}*, *bla_{QnrB}*, *bla_{QnrS}* s-a realizat prin tehnica PCR multiplex, rezultatele fiind apoi confirmate prin PCR simplex. De asemenea pentru genele *bla_{AAC(6)-Ib-cr}*, *bla_{mcr-1}* și *bla_{mcr-2}* identificarea s-a realizat prin PCR simplex. Designul primerilor și temperaturile specifice pentru fiecare etapă PCR sunt redată în tabele 5.5 și 5.6.

Tabelul 5.5 / Table 5.5.

Condițiile de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, mcr-1, mcr-2
PCR amplification conditions to identify genes encoding the enzymes qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, mcr-1, mcr-2

Gena	Condițiile	Referințe
Multiplex qnrA/qnrB/qnrS	94°C- 10 minute 94°C- 45 secunde 53°C- 45 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 7 minute  X32	Robicsek ș.a., 2006
aac-(6')-Ib-cr	94°C- 3 minute 94°C- 45 secunde 55°C- 45 secunde 72°C- 45 secunde 72°C- 5 minute  X34	Park ș.a.,2008
mcr-1	94°C- 15 minute 94°C- 30 secunde 58°C- 90 secunde 72°C- 60 secunde 72°C- 10 minute  X25	Liu ș.a.,2016
mcr-2	95°C- 2 minute 95°C- 3 minute 65°C- 30 secunde 72°C- 1 minut 72°C- 10 minute  X33	Xavier ș.a., 2016

Tabelul 5.6. / Table 5.6.

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, mcr-1, mcr-2

Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding the enzymes qnrA, qnrB, qnrS, aac- (6') -Ib-cr, mcr-1, mcr-2

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
qnrA	Fw: 5'-ATTCTCA CGCCAGGATTG-3' Rev: 5'-GATCGGCAAAGTTAGGTCA -3'	516	53°C	Robicsek ș.a., 2006
qnrB	Fw: 5'- GATCGTGAAAGCCAG AAAGG -3' Rev: 5'- ACGATGCCTGGTAGTTGTC -3'	469	53°C	Robicsek ș.a., 2006
qnrS	Fw:5'- ACGACAATTCGTCAACT GCAA -3' Rev: 5'- TAAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	417	53°C	Robicsek ș.a., 2006
aac-(6')-Ib-cr	Fw: 5'-TTGCCGA TGCTCTATAGTGGCTA-3' Rev: 5'-CTCGAATGCCTGGC GTGTTT-3'	482	55°C	Park ș.a.,2008
mcr-1	CLR5-F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTTC-3' CLR5-R: 5'-CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3'	309	64°C	Liu ș.a.,2016
mcr-2	MCR2-F: 5'- TGGTACAGCCCCCTTATT- 3' MCR2-R: 5'-GCTTGAGATTGGGTTATGA- 3'	190	64°C	Xavier ș.a., 2016

5.2. Investigarea profilului plasmidial al tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL

5.2.1. Material și metodă

1. Tehnica PCR-based replicon typing

Plasmidele sunt elemente genetice mobile ce conțin gene esențiale pentru controlul și inițierea replicării, dar și gene de rezistență sau virulență. Plasmidele pot fi transmise pe orizontală între populațiile bacteriene prin conjugare sau mobilizare (Francia ș.a, 2004).

Unul din factorii care au stat la bază răspândirii enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins pe scară largă și cu rapiditate este reprezentat de prezența genelor ce codifică aceste enzime la nivel plasmidic.

Importanța epidemiologică a identificării plasmidelor ce conferă rezistență la antibiotice este esențială pentru a analiza mecanismul de transmitere al genelor de rezistență. În acest sens, Carattoli A. și col. au dezvoltat o metodă de identificare a plasmidelor ce are la bază tehnica PCR de identificare a repliconilor (inc/rep) grupurilor majore de plasmide de incompatibilitate ce se întâlnesc la familia *Enterobacteriaceae* (Carattoli ș.a., 2005): FIC, A/C, P, T, B/O, K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1-Iy, F, X, N, Hi2, L/M și Hi1. Confirmarea pentru fiecare plasmidă pozitivă la PCR multiplex s-a realizat prin PCR simplex.

Temperaturile utilizate pentru fiecare etapă PCR precum și tipurile de secvențe de nucleotide analizate pentru fiecare plasmidă sunt sintetizate în tabelele 5.7 și 5.8.

În interpretarea rezultatelor se va acorda o atenție deosebită plasmidelor B/O și K, deoarece pot apărea reacții încrucișate bazate pe hibridizarea inc/rep. PCR-ul simplex realizat pentru a detecta plasmida B/O va identifica în mod specific doar repliconul B/O, în timp ce PCR-ul simplex realizat cu primeri pentru plasmida K va identifica ambii repliconi atât K cât și B/O (Carattoli ș.a., 2005).

Tabelul 5.7. / Table 5.7.

Condițiile de amplificare prin PCR pentru identificarea principalelor plasmide implicate în transmiterea markerilor de rezistență la antibiotice
PCR amplification conditions to identify the main plasmids involved in the transmission of antibiotic resistance markers

Plasmide	Condiții	Referințe
PBRT I (FIC, A/C, P, T, B/O)	94°C- 5 minute	Carattoli ș.a., 2005
PBRT II (K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y)	94°C- 30 secunde	
PBRT III (I1-Iy, F, X, N, Hi2, L/M, Hi1)	60°C- 30 secunde	
	72°C- 90 minut	
	72°C- 5 minute	

Tabelul 5.8. / Table 5.8.

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor plasmide implicate în transmiterea rezistenței la antibiotice

Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main plasmids involved in the transmission of antibiotic resistance

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
FIC	Fw: 5'-gtgaactggcagatgaggaagg -3' Rev: 5'-tctcctcgtgcgcaactagat -3'	262		
A/C	Fw: 5'-gagaaccaaaagacaagacctgga -3' Rev: 5'-acgacaaacctgaatgctcctt -3'	465		
P	Fw: 5'-ctatgcccctgcaaacgcgccagaaa -3' Rev: 5'-tcacgcccaggcgccagcc -3'	534		
T	Fw: 5'-ttggcctgtttgtgcctaaacat -3' Rev: 5'-cgtgattacacttagctttggac -3'	750		
B/O	Fw' Rev: 5'-tctgcgttcgcgccaagtctga -3'	159	60°C	Carattoli ș.a., 2005
K/B	Fw: 5'-gcggtccggaagccagaaaaac -3' Rev: 5'-tccttcacgagccgcgcaaa -3'	160		
W	Fw: 5'-cctaagaacaacaagcccccg-3' Rev: 5'-ggtcgcgcgcatagaacagt -3'	242		
FIIA	Fw: 5'-ctgtcgtgaagctgatggc-3' Rev: 5'-ctctgccacaacttcagc-3'	270		
FIA	Fw: 5'-ccatgctggttctagagaagg-3' Rev: 5'-gtatatccttactggttcgcag-3'	462		

* Pentru designul primerului B/O, secvența pentru catena sens este aceeași cu secvența utilizată pentru catena sens a primerului K/B

Tabelul 5.8. (continuare) / Continue of table 5.8.

Primeri	Secvențele de nucleotide (5'-3')	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
FIB	Fw: 5'- ggagttctgacacacgattttctg-3' Rew: 5'- ctccgctcgtctcaggccatt-3'	702		
Y	Fw: 5'- aattcaacaacacgtgcagctg-3' Rev: 5'- gcgagaatggacgattacaacattt-3'	765		
11-ly	Fw: 5'- cgaagcgggacgcagaa-3' Rev: 5'- tcgtcgttcgcccaagttcg-3'	139		
F	Fw: 5'- gatcgtttaaggaaattttg-3' Rev: 5'- gaagatcagtcacaccatcc-3'	270		
X	Fw: 5'- aaccttagaggctatttaagttgctgat-3' Rev: 5'- tgagagtcatttttatctcatgttttagc-3'	376	60°C	Carattoli ș.a., 2005
N	Fw: 5'- gtctaacgagcttacccaag-3' Rev: 5'- gtttcaactctgcccaagttc-3'	559		
Hi2	Fw: 5'- ttctcctgagtcaccctgttaacac-3' Rev: 5'- ggctcactaccgttgctatcct-3'	644		
Hi1	Fw: 5'- ggagcgatggattacttcagtagc-3' Rev: 5'- gccgtttcaccctcgtgagta-3'	471		
L/M	Fw: 5'- ggatgaaaactatcagcatctgaag-3' Rev: 5'- ctgcaggggcgattcttttagg-3'	785		

* Pentru designul primerului B/O, secvența pentru catena sens este aceeași cu secvența utilizată pentru catena sens a primerului K/B

2. Experimentul de conjugare

Procesul de conjugare la bacterii a fost descris pentru prima dată în 1946 de către Lederberg fiind observat la tulpina de *E.coli* K12, ulterior fiind identificat și la alte specii bacteriene. Această modalitate de recombinare genetică este principala cale de transfer orizontal de material genetic între bacterii, întâlnit mai ales la bacteriile Gram-negative.

Tulpinile alese pentru a realiza experimentul de conjugare au fost cele confirmate molecular ca fiind purtătoare ale genei ce codifică enzimele CTX-M iar din punct de vedere fenotipic au fost sensibile la acidul nalidixic. Experimentul a fost realizat prin metoda conjugarea în bulion nutritiv, iar tulpina utilizată ca receptor a fost K12 rezistentă la acid nalidixic.

Protocolul de lucru a urmărit însămânțarea tulpini donatoare (*E.coli* CTX-M pozitivă) și cea receptoare (*E.coli* K12) în mediul lichid bulion nutritiv și incubarea la 37°C timp de 24h. Următoarea etapă a constat în realizarea unui amestec format din 3 ml bulion cu tulpina donatoare și 4 ml bulion ce conține tulpina receptoare și incubarea la 37°C timp de 1h. Din amestecul incubat se însămânțează o placă de agar nutritiv suplimentat cu cefotaxim (1mg/L) și acid nalidixic (30mg/L) și se incubează din nou la 37°C timp de 24h. Coloniile bacteriene izolate pe agar sunt testate fenotipic prin metoda discurilor combinate și apoi sunt caracterizate molecular prin PCR (Măciucă, 2014).

5.3. Rezultate și discutii

5.3.1. Identificarea principalelor gene codante ce codifică enzimele ESBL

În vederea izolării principalelor gene codante ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins au fost analizate prin tehnica PCR cele 117 tulpini de enterobacterii de origine umană și animală izolate în urma screening-ului bacteriilor producătoare de ESBL.

Pentru cele 81 de tulpini de origine animală analizate, testele de biologie moleculară au evidențiat prezența genei *bla*_{CTX-M-U} pentru 34/81 (42%) tulpini (fig.5.1.). Analizând situația raportat la proveniența probelor, deși animalele de la padocuri nu prezentau un istoric în tratamentul cu antibiotice, procentajul 50% (17/34) al tulpinilor CTX-M pozitive a fost egal cu cel al tulpinilor izolate de la animalele de la cabinetele veterinare (17/34).

Caracterizarea grupurilor CTX-M la tulpinile de origine animală a semnalat prezența genei *bla*_{CTX-M-1} la 24/34 (70,59%) dintre tulpinile analizate, acesta fiind grupul dominant, în timp ce prezența genei *bla*_{CTX-M-9} a fost identificată la 9/34 (26,5%) dintre tulpini. Pentru gena *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-2} și *bla*_{CTX-M-25} nu au fost identificate tulpini de origine animală pozitive (fig.5.2.). De asemenea o tulpină dintre izolatele pozitive la screening-ul genelor *bla*_{CTX-M-U} nu a putut fi identificată ca aparținând nici uneia din cele 5 grupuri de enzime CTX-M.

Enzimele de tip TEM și SHV, marea lor majoritate sunt enzime de tip beta-lactamaze cu spectru extins, excepție făcând TEM-1, TEM-3 și TEM-13 (Ewers ș.a., 2011; Livermore, 1995).

Spre deosebire de enzimele ESBL de tip TEM și SHV, enzimele OXA (clasa D) marea lor majoritate sunt non-ESBL, excepție făcând OXA-10, OXA-2 și derivații acestora (Ewers ș.a.,2011).

Prezența genelor *bla*_{TEM} a fost identificată la 22/81 (27,16%) dintre izolatele de origine animală, în timp ce prezența genelor *bla*_{SHV} la 13/81 (16,04%) dintre izolate, iar *bla*_{OXA} la o singură din 81(1,23%) de tulpini de origine animală (fig.5.1.).

Pentru a stabili cu exactitate prevalența genelor TEM, SHV și OXA de tip ESBL rezultatele obținute la testele de biologie moleculară au fost corelate cu rezultatele testelor de confirmare fenotipică a tulpinilor prezumtiv ESBL. Din totalul de 18 tulpini la care au fost identificate doar genele TEM, SHV și OXA, 8 au fost confirmate fenotip ca fiind ESBL ceea ce sugerează că tulpinile izolate de noi sunt producătoare de ESBL. Pentru restul de 10 tulpini purtătoare de gene TEM, SHV sau OXA neconfirmate fenotipic s-a realizat secvențierea genelor.

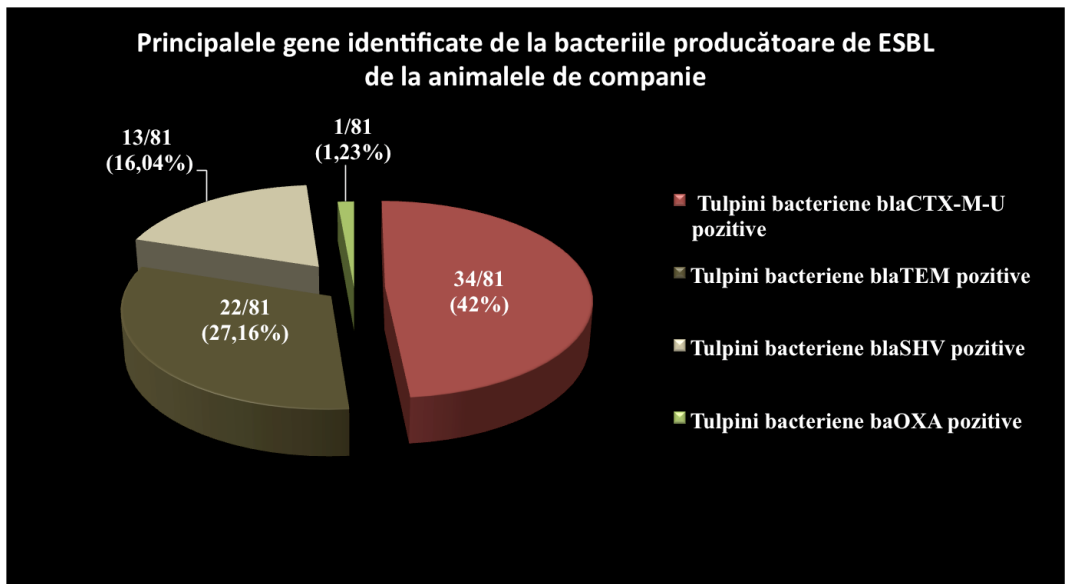


Fig.5.1. Principalele gene identificate de la bacteriile producătoare de ESBL de la animalele de companie

Fig.5.1. The main genes identified in ESBL producing bacteria

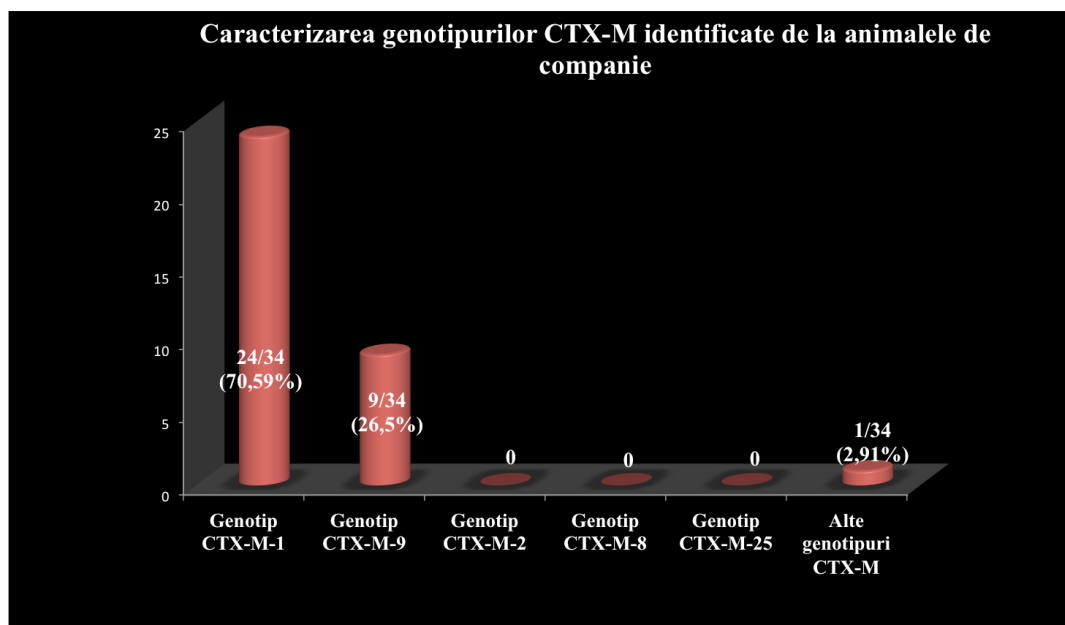


Fig.5.2. Spectrul tulpinilor bacteriene CTX-M-U pozitive

Fig.5.2. Spectrum of CTX-M-U positive bacterial strains

Studiul realizat de noi privind caracterizarea substratului molecular al tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie este primul de această natură realizat în România. Dacă analizăm prevalența purtătorilor de *E.coli* CTX-M pozitive izolate doar de la câinii sănătoși clinic din padocuri raportată la numărul total de probe recoltate de la această grupă (88 de probe de materii fecale), observăm că aceasta este 19,31% (17/88) (fig.5.3.) apropiată de cea obținută în Franța, 18,5% în cadrul celui mai mare studiu realizat pentru determinarea portajului fecal cu tulpini producătoare de ESBL/AmpC realizat pe 368 de câini clinic sănătoși (Haenni ș.a.,2014). O prevalență mai mare, de 24% a câinilor clinic sănătoși purtători de tulpini producătoare de CTX-M a fost raportată în China în anul 2010 (Sun ș.a.,2010).

Prevalența obținută de noi pentru câinii din padocuri purtătorii de gene *bla*_{CTX-M} este crescută dacă analizăm importanța portajului fecal cu tulpini rezistente pentru sănătatea publică. Contactul direct cu omul favorizează transmiterea acestor tulpini. Mai mult decât atât, tulpinile producătoare de enzime beta-lactamaze cu spectru extins sunt de cele mai multe ori asociate și cu rezistența la alte clase de antibiotice: fluorochinolone, aminoglicozide și trimetoprim+sulfometoxazol (Coque ș.a., 2008). Rezistența multiplă determinată de tulpinile producătoare de ESBL poate fi explicată prin prezența plasmidelor care poartă genele *bla*CTX-M și care transportă frecvent și gene care conferă rezistență la clasele de antibiotice amintite anterior (Sallem ș.a., 2014; Wieler ș.a., 2011).

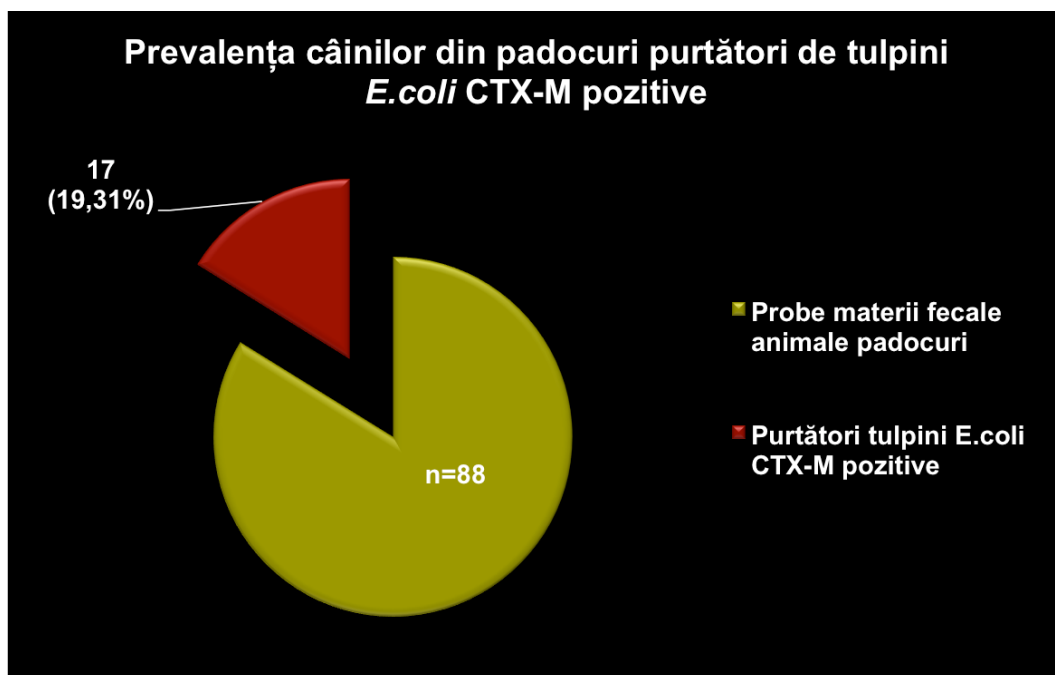
Fig.5.3. Prevalența purtătorilor de tulpini *E.coli* CTX-M pozitive din padocuri

Fig.5.3. Prevalence of carriers of *E.coli* producing CTX-M isolated from dogs feces from dog shelters

Analizând comparativ prevalența (42%) genelor de tip CTX-M izolate de la animalele de companie cu prevalența aceluiași gene obținută de Măciucă și col. pentru puii broiler în România, observăm că prevalența obținută de noi este aproape similară cu 36,95% obținută în studiul amintit anterior. Considerăm că istoricul în tratamentul diversificat și a la long cu antibiotice (Synulox, Enrofloxacin, Cefadroxil) al animalelor analizate de noi justifică prevalența crescută obținută.

O parte din izolatele de origine animală caracterizate molecular prin prezența genelor ce codifică enzimele CTX-M-1, CTX-M-9, TEM și SHV au fost supuse secvențierii, rezultatele obținute fiind redată în tabelul 5.9. Din totalul de 24 de gene *bla*_{CTX-M-1} identificate de la animalele de companie au fost supuse secvențierii 10, fiind astfel identificate genele *bla*_{CTX-M-1} (5/10 izolate) și *bla*_{CTX-M-15} (5/10 izolate). Pentru izolatele producătoare de CTX-M-9 au fost secvențiate 9 tulpini și au fost identificate genele *bla*_{CTX-M-14} (7/9 tulpini) și *bla*_{CTX-M-9} (2/9 tulpini). În cazul izolatului de origine animală la care nu a fost identificat grupul CTX-M, în urma secvențierii a fost identificată gena *bla*_{CTX-M-3} ce face parte tot din grupul de gene *bla*_{CTX-M-1}.

Pentru izolatele de origine animală caracterizate molecular prin prezența genelor ce codifică enzimele TEM și SHV au fost supuse secvențierii 4/22 tulpini pentru TEM și 5/13 pentru SHV. Pentru toate cele 4 izolate TEM pozitive s-a

identificat gena *bla*_{TEM-1} , iar pentru tulpinile SHV la 2 a fost identificată gena *bla*_{SHV-2} și la 3 izolate gena *bla*_{SHV-52}. Niciuna din genele TEM sau SHV identificată în urma secvențierii nu face parte din grupul de enzime ESBL.

Tabelul 5.9. / Table 5.9.

Rezultatele secvențierii genelor de tip CTX-M, TEM, SHV izolate de la tulpinile de origine animală
CTX-M, TEM, SHV gene sequencing results isolated from animal strains

Grupul de gene	Gena identificată	Nr . de izolate
CTX-M-1	CTX-M-1	5
	CTX-M-15	5
CTX-M-9	CTX-M-14	7
	CTX-M-9	2
CTX-Mu	CTX-M-3	1
TEM	TEM-1	4
SHV	SHV-2	2
	SHV-52	3

Ca și în cazul izolatelor de origine animală, cele 36 de tulpini de enterobacterii de origine umană obținute în urma screening-ului ESBL au fost analizate molecular.

Prevalența genelor CTX-M pentru izolate umane este de 38,89% (14/36) (fig.5.4.). Tulpinile pozitive pentru gena *bla*_{CTX-M-U} au fost caracterizate molecular din punct de vedere a apartenenței la unul din cele cinci grupuri de enzime CTX-M. Pentru grupul de enzime CTX-M-1 au fost identificate pozitive 64,28% (9/ 14) dintre tulpini, pentru grupul CTX-M-9 au fost pozitive 28,57% (4/14), iar o tulpină din 14 (7,15%) nu a aparținut niciunuia din cele 5 grupuri de enzime CTX-M. Ca și în cazul izolatelor de origine animală, genele ce codifică grupurile de enzime CTX-M-2, CTX-M-8 și CTX-M-25 nu au fost izolate la nicio tulpină bacteriană (fig.5.5.).

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

- gena *bla*_{TEM} a fost identificată la 15/36 (41,67%) din tulpinile analizate;
- gena *bla*_{SHV} la 5/36 (13,89%) din izolatele analizate;
- gena *bla*_{OXA} la 3/36 (8,33%) din tulpinile caracterizate molecular (fig.5.4.).

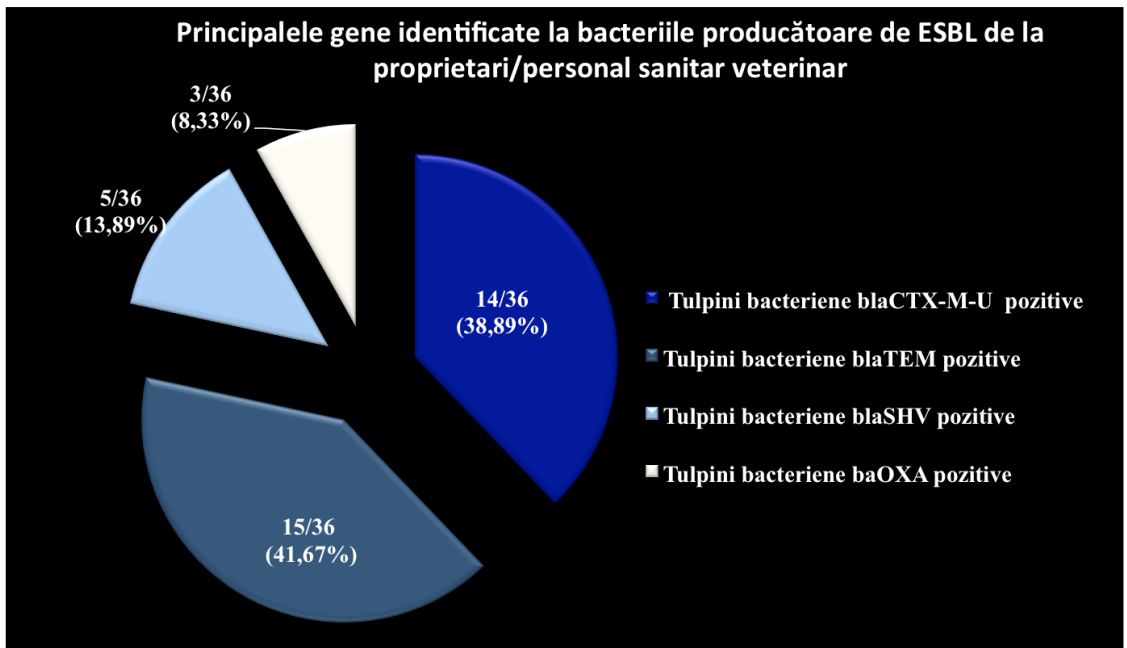


Fig.5.4. Spectrul principalelor gene identificate de la bacteriile producătoare de ESBL de la proprietari/personal sanitar veterinar

Fig.5.4. Spectrum of the main identified genes from owners / sanitary veterinary staff

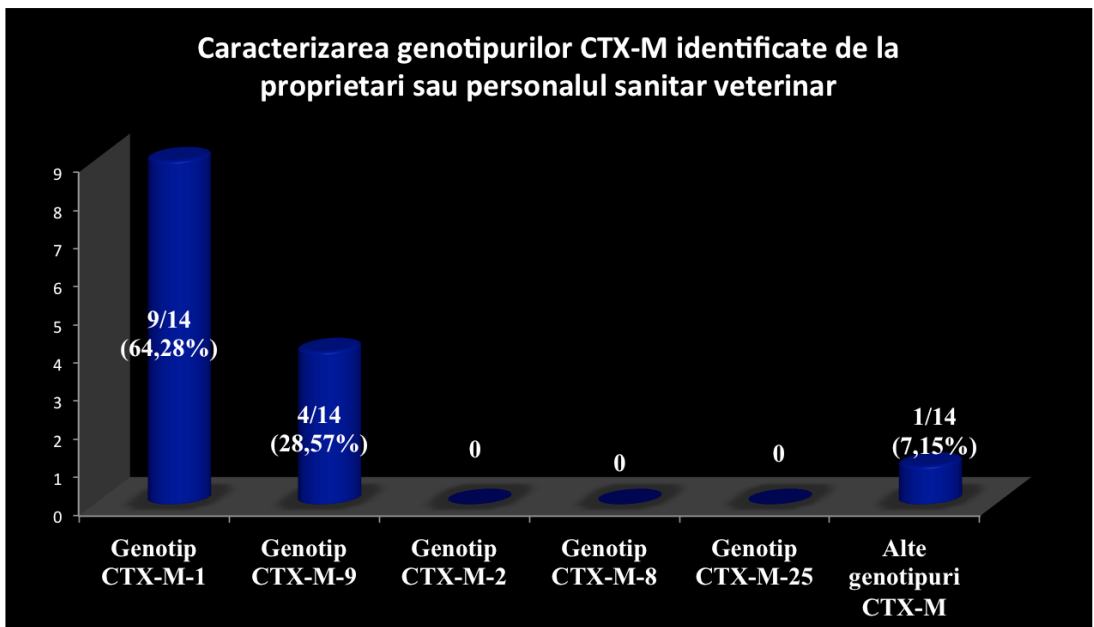


Fig.5.5. Spectrul genotipurilor ESBL de tip CTX-M identificate de la tulpinile bacteriene de origine umană

Fig.5.5. Spectrum of CTX-M type ESBL identified from human bacterial strains

Rezultatele obținute de noi pentru prevalența grupurilor CTX-M la izolatele umane sunt în concordanță cu rezultatele altor studii realizate în România pe tulpini de enterobacterii producătoare de ESBL 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 cuprinse între <49 și/sau 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).

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.

Ca și în cazul izolatelor de origine animală, o parte din tulpinile bacteriene de origine umană caracterizate molecular prin prezența genelor ce codifică enzimele CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-U, TEM și OXA au fost supuse secvențierii. Din cele 9 izolate CTX-M-1 pozitive, au fost secvențiate 5 și au fost identificate genele *bla*_{CTX-M-1} (2/5 tulpini) și *bla*_{CTX-M-15} (3/5 tulpini). Din cele 4 tulpini CTX-M-9 au fost secvențiate 4/4 și toate au fost identificate ca fiind *bla*_{CTX-M-14}. Tulpina CTX-M-U pozitivă și care nu a fost încadrată în niciunul din cele 5 grupuri CTX-M, în urma secvențierii a fost identificată gena *bla*_{CTX-M-3} ce codifică enzimele ce fac parte din grupul CTX-M-1. Din cele 15 izolate TEM de origine umană au fost secvențiate 3, pentru 2/3 tulpini fiind identificată gena *bla*_{TEM-1}, iar pentru o tulpină din cele 3 gena *bla*_{TEM-55}.

Din cele 3 izolate de origine umană OXA pozitive a fost secvențiată o singură tulpină fiind identificată gena *bla*_{OXA-1}. Genele *bla*_{TEM} și *bla*_{OXA} identificate în urma secvențierii nu codifică enzime ESBL, ci doar enzime beta-lactamaze. Rezultatele secvențierii pentru izolatele de origine umană sunt sintetizate în tabelul 5.10.

Tulpinile bacteriene care au crescut pe mediul utilizat pentru screening-ul ESBL și care nu au fost confirmate fenotipic prin metoda discurilor combinate au fost de asemeni testate molecular pentru screening-ul genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins. În urma investigațiilor, la tulpinile menționate anterior nu a fost identificată nicio genă de rezistență. Rezultatul negativ nu confirmă că aceste izolate nu sunt producătoare de ESBL, ci este posibil ca markerii de rezistență să fie plasați pe cromozom, sau au alte gene ce codifică enzimele beta-lactamază cu spectru extins și care nu au fost analizate în prezentul studiu.

Tabelul 5.10 / Table 5.10.

Rezultatele secvențierii genelor de tip CTX-M, TEM, OXA izolate de la tulpinile de origine umană
CTX-M, TEM, OXA gene sequencing results isolated from human strains

Grupul de gene	Gena identificată	Nr . de izolate
CTX-M-1	CTX-M-1	2
	CTX-M-15	3
CTX-M-9	CTX-M-14	3
CTX-Mu	CTX-M-3	1
TEM	TEM-1	2
	TEM-55	1
OXA	OXA-1	1

Prezența tulpinilor de *E.coli* producătoare de AmpC constituie de asemenea 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 enzimelor de tip ESBL.

Beta-lactamazele de tip AmpC sunt codate de gene ce sunt dispuse la nivel plasmidial, prezintă un spectru larg de activitate și nu sunt inhibitate de acțiunea inhibitorilor de beta-lactamaze.

Toate cele 117 tulpini bacteriene izolate în urma screening-ului ESBL au fost investigate prin PCR multiplex pentru toate cele 6 grupuri gene ce codifică enzimele AmpC (CIT-M, ACC, FOX, MOX, DHA, EBC), iar ulterior rezultatele pozitive au fost confirmate prin PCR simplex.

La animalele de companie, din cele 81 de tulpini analizate, o singură tulpină (1,23%) a fost pozitivă pentru grupul de gene CIT-M din care fac parte genele *bla*_{LAT-1-LAT-4}, *bla*_{CM-Y-2-CMY-7}, *bla*_{BIL-1}, *bla*_{CMY-2} (fig.5.6.).

Rezultatele obținute de noi sunt în concordanță cu cele menționate în literatura de specialitate, prevalența tulpinilor producătoare de AmpC în rândul populațiilor de câini sănătoși fiind cuprinsă între 1-39% (Carattoli ș.a.,2005; Wedley ș.a., 2011; Tamang ș.a., 2012; Belas ș.a., 2014; Okubo ș.a., 2014).

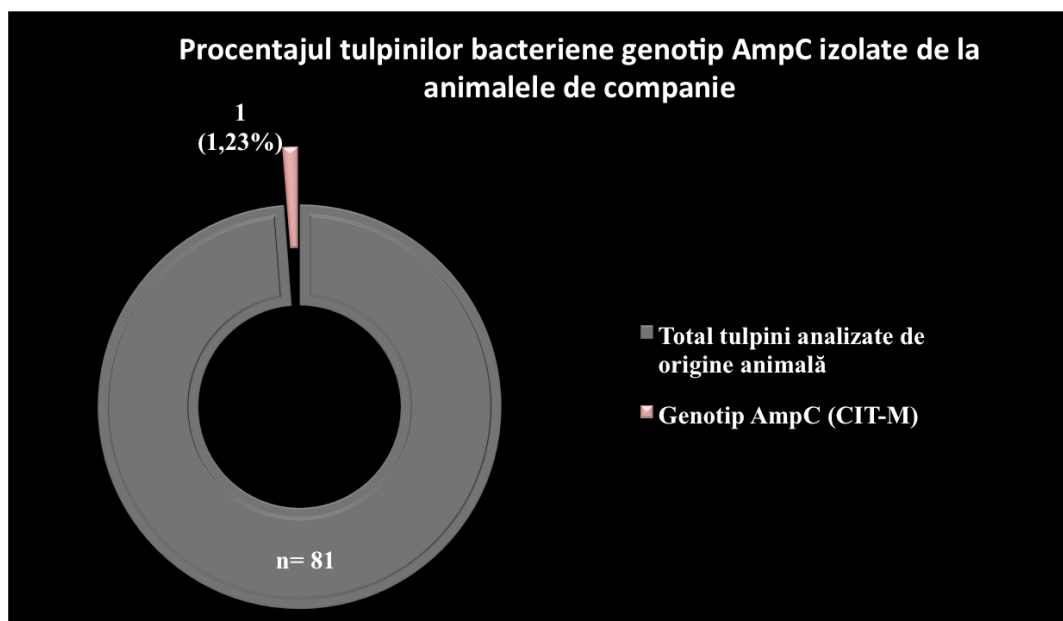


Fig.5.6. Prevalența tulpinilor bacteriene de origine animală AmpC pozitive
Fig.5.6. Prevalence of animal bacterial strains producing AmpC beta-lactamases

Dacă analizăm rezultatele obținute de noi cu rezultatele obținute de Măciucă I. în anul 2014, prevalența obținută de noi este în discordanță (mult mai scăzută), însă rezultatele sunt greu de comparat deoarece numărul de tulpini și segmentul de animale analizate diferă (Măciucă, 2014).

În ceea ce privește restul genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze, toate tulpinile de origine animală analizate au fost negative.

Ca și în cazul izolatelor de origine animală, tulpinile bacteriene de origine umană obținute în urma screening-ului ESBL au fost testate molecular pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze. Niciun izolat, din cele 36 de origine umană nu a fost pozitiv pentru nicio gena *bla*_{AmpC}.

5.3.2 Identificarea principalelor gene codante ce codifică rezistența la fluorochinolone și colistin.

Motivația investigării tulpinilor analizate și pentru rezistența la alte clase de antibiotice, în special fluorochinolone a avut la bază literatura de specialitate, conform căreia plasmidele care transmit rezistența la beta-lactami transmit simultan și markeri de rezistență la alte clase de antibiotice (Efttekhar ș.a.,2015).

Tulpinile caracterizate molecular din punct de vedere al genelor ce codifică enzimele de tip ESBL au fost testate pentru izolarea genelor *bla*_{qnrA}, *bla*_{qnrB}, *bla*_{qnrS} și *bla*_{aac-(6')-Ib-cr} (gena ce codifică rezistența la Ciprofloxacin).

În urma testelor moleculare realizate cu scopul de a caracteriza rezistența la fluorochinolone, 1/81 (1,23%) dintre tulpinile animale a fost pozitivă pentru

gena *bla_{qnrA}*, 3/81 (3,70%) dintre izolatele analizate au fost pozitive pentru gena *bla_{qnrB}* și 11/81 (13,58%) dintre tulpini au fost pozitive pentru gena *bla_{qnrS}*. Pentru rezistența la Ciprofloxacin, gena *bla_{aac(6')-Ib-cr}* a fost identificată la 3/81 (3,70%) dintre tulpinile de origine animală analizate (fig.5.7.).

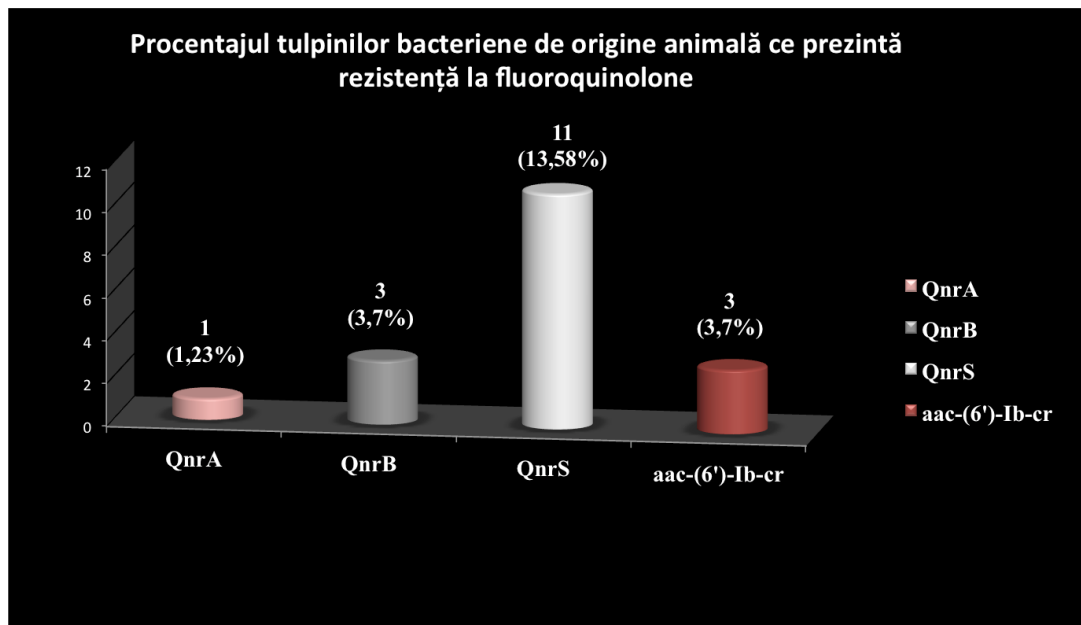


Fig.5.7. Prevalența tulpinilor de origine animală pozitive pentru markerii de rezistență la fluoroquinolone

Fig.5.7. Prevalence of animal strains positive for markers of resistance to fluoroquinolones

De asemenea, dacă analizăm pe segmente de proveniență a probelor prevalența obținută de noi, constatăm că pentru gena *bla_{qnrS}* prevalența în rândul tulpinilor izolate din materiile fecale ale animalelor de companie de la cabinete este mult mai mare (63,63%; 7/11) față de prevalența (36,36%; 4/11) pentru aceeași genă pentru tulpinile izolate din materiile fecale ale câinilor din padocuri, rezultate explicabile dacă luăm în calcul istoricul în tratamentul cu antibiotice (administrarea de Enrofloxacin) al animalelor de companie de la cabinete.

Prezența *qnrA* și *aac(6')-Ib-cr* în aceeași celulă bacteriană are drept consecință creșterea gradului de rezistență de peste 4 ori față de gradul de rezistență conferit doar de *qnrA*. Mai mult decât atât prezența genei *bla_{aac-(6')-Ib-cr}* favorizează selecția mutațiilor cromozomiale ce au ca rezultat rezistența la Ciprofloxacin (Park ș.a., 2006). O astfel de tulpină de *E.coli* de origine animală a fost izolată și în studiul nostru, aceasta fiind caracterizată molecular și prin prezența genelor *bla_{TEM}* și *bla_{SHV}*.

Toate tulpinile de origine animală la care au fost puse în evidență markerii de rezistență la fluoroquinolone au fost pozitive și pentru genele ce codifică

enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, teorie susținută și de literatura de specialitate.

Situația tulpinilor bacteriene de origine umană purtătoare de gene ce determină rezistența la clasa fluoroquinolone este sintetizată în fig.5.8., observându-se o prevalență de 2,78% (1/36) a izolatelor purtătoare de gene *bla_{qnrB}*, 13,89% (5/36) pentru tulpinile bacteriene purtătoare de gene *bla_{qnrS}* și 5,56% (2/36) pentru izolatele *aac-(6')-Ib-cr* pozitive. Spre deosebire de tulpinile de origine animală analizate, în cazul izolatelor umane nu a fost pusă în evidență nicio tulpină pozitivă pentru gena *bla_{qnrA}*. De asemeni toate tulpinile pozitive pentru genele menționate anterior au fost asociate și cu prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins: *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{OXA}*, asociere ce a fost descrisă și în alte studii similare (Măciucă ș.a, 2015).

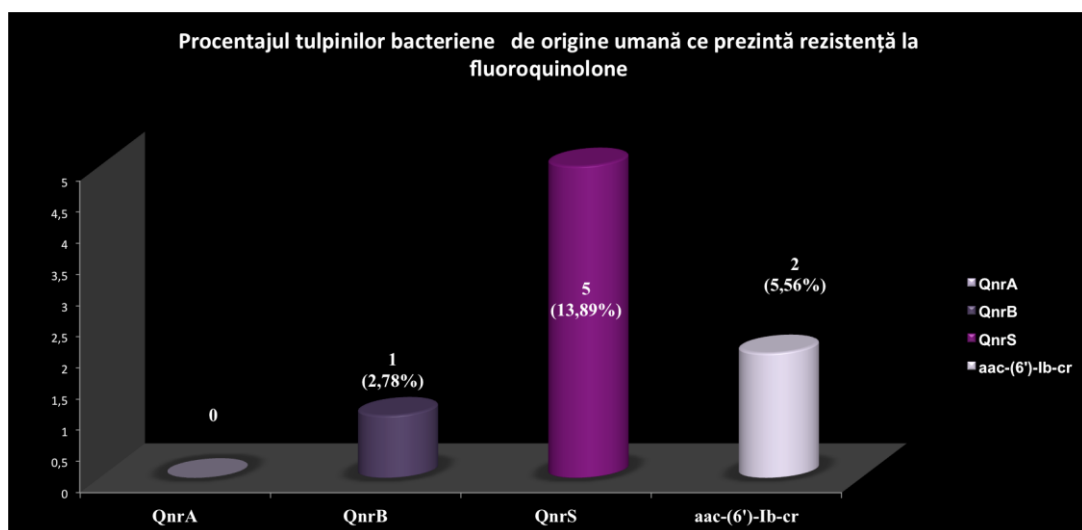


Fig.5.8. Prevalența tulpinilor de origine umană pozitive pentru rezistența la fluoroquinolone

Fig.5.8. Prevalence of human strains positive for fluoroquinolone resistance

Analizând comparativ rezultatele noastre atât pentru tulpinile de origine umană cât și pentru tulpinile de origine animală, observăm că:

- prevalența obținută de noi pentru QnrB și QnrS se încadrează în intervalul de prevalență obținut de Măciucă în cadrul unui studiu realizat în anul 2014 pe tulpini de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la pui;
- deși literatura de specialitate menționează că rezistența la Ciprofloxacin determinată de prezența genei *bla_{aac-(6')-Ib-cr}* este mai ridicată decât rezistența determinată de genele *bla_{qnr}*, prevalența obținută de noi este mult mai scăzută, rezultat justificat dacă corelăm informațiile cu anamneza animalelor luate în studiu și care au fost tratate în special cu Enrofloxacin și nu cu Ciprofoxacin.

În urma realizării testelor de biologie moleculară cu scopul de a izola markerii ce determină rezistența la colistin, toate izolatele analizate, atât cele de

origine animală cât și cele de origine umană au fost negative pentru genele ce codifică enzimele MCR-1 și MCR-2. Deși rezultatele investigațiilor noastre au fost negative, sunt semnalate în literatura de specialitate studii realizate în țări precum Japonia sau China unde a fost pus în evidență portajul fecal cu tulpini pozitive pentru gena *bla_{mcr-1}* la animalele de companie (Lei ș.a., 2017). În Europa, rezultate similare cu cele obținute de noi au fost semnalate în Elveția, unde nu au fost izolate tulpini de *E.coli* cu rezistență mediată plasmidic la colistin în rândul populațiilor de câini și pisici clinic sănătoase (Simmen ș.a,2016).

Chiar dacă până în prezent, animalele de companie din arealul geografic analizat nu sunt un rezervor de enterobacterii pozitive pentru rezistența mediată plasmidic la colistin, contactul cu animalele de companie din țări cu prevalență ridicată a rezistenței antimicrobiene, de exemplu prin comerțul internațional sau călătorie, poate fi considerat un risc pentru transmiterea tulpinilor bacteriene producătoare de MCR-1 și MCR-2.

5.3.3. Identificarea plasmidelor bacteriene implicate în transmiterea enzimelor ESBL

Unul din factorii principali care a favorizat răspândirea tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL pe scară largă și cu rapiditate este reprezentat de prezența genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins pe elemente genetice mobile cum sunt plasmidele. Caracterizarea profilului plasmidial este esențial pentru a înțelege mecanismul de transmitere al izolatelor producătoare de ESBL atât intra cât și interspecie.

Caracterizarea plasmidelor pe care se găsesc genele de rezistență identificate de noi la tulpinile analizate a fost realizat prin tehnica PBRT descrisă la subsubcapitolul 5.2.1.

Au fost investigate toate tulpinile (n=78) care au fost caracterizate molecular prin prezența genelor de rezistență la antibiotice.

Izolatele au fost testate pentru 18 repliconi investigați, dintre aceștia 12 fiind identificați la tulpinile analizate. Repliconii K/B, P1, FIA, FIB, Y, I1, F, N, Hi2, L/M au fost depistați atât la tulpinile bacteriene de origine umană cât și animală. Pentru tulpinile izolate de la animale au fost identificați în plus și repliconii A/C și FIIA. Pentru tulpinile de origine umană pe lângă plasmidele amintite anterior a fost identificată și plasmida W. De asemeni pentru toate izolatele investigate au fost identificați repliconi multipli.

Plasmidele de tip FIB au fost identificate în procente ridicate atât pentru tulpinile de origine animală, cât și pentru cele de origine umană (52,83% animale, respectiv 64% izolate umane). De asemeni tulpinile bacteriene la care au fost puși în evidență repliconii amintiți anterior sunt caracterizate molecular de prezența genelor *bla_{CTX-M-9}* și *bla_{TEM}* sau *bla_{SHV}*. În literatura de specialitate sunt menționate studii realizate pe același segment de subiecți ca și în cazul prezentului studiu,

acestea semnalând prezența plasmidei FIB ca fiind dominantă în transmiterea markerilor de rezistență la animalele de companie (Carratoli ș.a., 2008; Carratoli, 2013; Damborg ș.a., 2015; Falgenhauer ș.a., 2014).

Deși literatura de specialitate menționează mai des la tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la animale asociațiile dintre plasmida FIB/FIA/FII, în investigațiile realizate de noi au fost puse în evidență cu o frecvență mai mare asociații între plasmida FIB/F, FIB/I1 pentru tulpinile de origine animală și FIB / F/ I1 pentru tulpinile de origine umană.

Studii similare menționează că plasmidele de tip F prezintă frecvent mai mult decât un replicon și că sunt responsabile pentru transmiterea genelor *bla*_{CTX-M-15} asociate cu *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} și *bla*_{aac-(6')-Ib-cr} (Carattoli, 2009). În studiul nostru, plasmidele F, alături de plasmidele FIB și I1 au avut frecvența cea mai ridicată, fiind identificate în procent de 26,41 la tulpinile de origine animală și în procent de 64 la tulpinile de origine umană. De asemeni așa cum menționează literatura de specialitate, plasmida F a fost identificată la tulpini bacteriene caracterizate molecular de prezența genelor *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}.

De asemeni studiile de specialitate demonstrează și susțin existența unei corelații între plasmidele I1 și transmiterea genelor *bla*_{CTX-M-1} la om și păsări (Accogli ș.a., 2013). În urma investigațiilor realizate de noi plasmida I1 a fost asociată cu prezența plasmidei F fiind identificată nu doar la tulpini producătoare de CTX-M-1 ci și la tulpini producătoare de CTX-M-9, TEM și SHV.

Plasmida Hi2 a fost identificată în proporție de 11,32% (6/53) la tulpinile de origine animală și în proporție de 16% (4/25) la tulpinile de origine umană. Prezența plasmidei Hi2 este asociată și responsabilă în principal de transmiterea genelor *bla*_{SHV} (Liakopoulos ș.a., 2016). Există însă studii care susțin rolul plasmidei Hi2 și în transmiterea genelor ce codifică enzimele din grupul CTX-M (Veldman ș.a., 2010). În studiul nostru plasmida Hi2 a fost asociată mai frecvent cu genele *bla*_{CTX-M-1} și *bla*_{qnrS}, studii similare semnalând prezența acestei plasmide la tulpini de *E.coli* izolate de la animale de companie clinic sănătoase (Jackson ș.a., 2015).

În ceea ce privește plasmida P1, studii realizate în Europa susțin asocierea dintre aceasta plasmidă și plasmida Hi2 și implicațiile acestora în transmiterea genei *bla*_{CTX-M-2} (Hopkins ș.a., 2006; Marcade ș.a., 2009; Măciucă, 2014). Investigațiile realizate de noi au pus în evidență plasmida P1 la 2/53 (3,78%) dintre tulpinile de origine animală și doar la o tulpină de origine umană. Spre deosebire de studiile anterioare, în urma investigațiilor realizate a fost pusă în evidență asocierea dintre plasmida P1 și FIB/Y/N/ I1 și FIB/F pentru izolatele de origine animală, iar la tulpina de origine umană nu a existat o asociere cu o altă plasmidă. De asemeni din punct de vedere al genelor de rezistență identificate la izolatele pozitive pentru plasmida P1, acestea au fost în principal asociații de *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM}, urmate apoi de asociații cu *bla*_{SHV} și *bla*_{qnrS}.

O altă plasmidă identificată la izolatele analizate a fost FIA. Aceasta a fost identificată cu o frecvență mai mare la tulpinile de origine umană (5/25) și doar la o tulpină de origine animală, fiind asociată cu prezența plasmidelor FIB/F, FIB/W/K/N/ F sau FIB/ L/M la tulpinile de origine umană și FIB/Y la tulpina de origine animală. De asemeni izolatele la care a fost identificată această plasmidă au fost pozitive pentru următoarele asocieri de gene: *bla_{qnrB}/bla_{TEM}/bla_{SHV}*; *bla_{aac}-(6')-lb-cr/ bla_{qnrS}/bla_{OXA}*; *bla_{aac}-(6')-lb-cr/ bla_{OXA}/ bla_{TEM}/ bla_{CTX-M-1}*; *bla_{TEM}/ bla_{CTX-M-1}* ; sau doar *bla_{TEM}* ori *bla_{CTX-M-9}*. În literatura de specialitate au mai fost menționate studii cu referire la identificarea plasmidei FIA la animalele de companie. De asemeni această plasmidă este identificată cu o frecvență mai mare la tulpinile de origine umană (Jackson ș.a.,2015; Maciucă, 2014).

Plasmida IncN a fost identificată fie singură, fie asociată cu alte plasmide la 4/53 dintre tulpinile de origine animală (3 izolate de și un izolat de *Klebsiella pneumoniae*). La tulpinile de origine umană a fost izolată la 3/25 dintre tulpini, toate aparținând speciei *E.coli*. Există studii în literatura de specialitate care menționează prezența repliconului IncN la tulpini de izolate de la om, bovine, cai, porci și păsări de apă sălbatică (Dolejska ș.a., 2013; Măciucă, 2014). Pentru izolatele de la animalele de companie, literatura de specialitate menționează prezența plasmidei IncN la specia *Klebsiella pneumoniae* (Donati ș.a.,2014). În plus față de cele menționate anterior, în studiul nostru am identificat prezența plasmidei IncN și la izolate ce aparțin speciei *E.coli* .

Repliconul IncL/M a fost identificat în aceleași proporții atât la tulpinile de origine animală cât și la cele de origine umană (un singur izolat). Plasmida L/M este capabilă să reziste în diferite nișe ecologice chiar și în absența presiunii selective a antibioticelor și deși din punct de vedere geografic repliconii IncL/M au fost mai frecvent identificați la *Enterobacteriaceae* provenite din zona mediteraneană și din Europa de Vest, prezența acestora a fost menționată și în Europa de Est în țări precum Franța sau Belgia și este responsabilă pentru diseminarea genei *bla_{CTX-M-3}* (Carattoli, 2009; Adamczuk ș.a., 2015).

Ca și în cazul plasmidei L/M, repliconul IncK a fost identificat atât de la animale cât și de la om, la un singur izolat. Literatura de specialitate asociază această plasmidă cu difuzia epidemică a genei *bla_{CTX-M-14}* (ce aparține grupului de gene *bla_{CTX-M-9}*) în Europa atât la animale cât și la om (Liebana ș.a.,2006; Navarro ș.a., 2007; Diestra ș.a.,2009; Marcadé ș.a.,2009). Investigațiile noastre au arătat că izolatul de origine umană pozitiv pentru plasmida K a fost caracterizat molecular de asocierea genelor *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{qnrB}* și de prezența repliconilor multipli FIB/FIA/W/N/F, în timp ce izolatul de origine animală s-a caracterizat prin prezența genei *bla_{CTX-M-9}* și asocierea repliconilor FIB/I1.

Repliconul IncFIIA a fost pus în evidență la o singură tulpină de origine animală. Prezența acestuia a fost asociată cu repliconul IncL/M și cu genele *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* și *bla_{CTX-M-1}*. Această plasmidă a mai fost identificată de la animalele

de companie, însă frecvent a fost asociată cu FIA/FIB sau FIB/FIC/I1 (Falgenhauer ș.a.,2014).

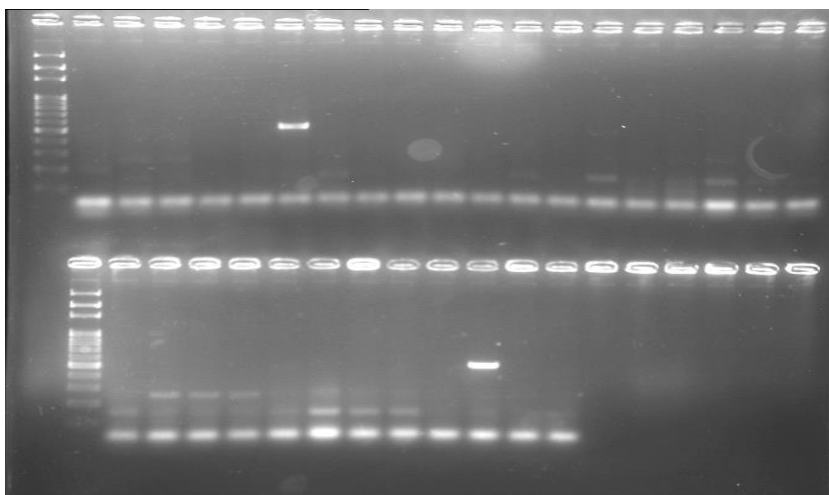
Plamida Y a fost identificată la 2/53 dintre tulpinile de origine animală și doar la o tulpină de origine umană. Aceasta este asociată la animalele de companie cu transmiterea genei *bla*_{CTX-M-14} (Timofte ș.a.,2016).

Repliconul IncW a fost identificat doar de la o singură tulpină din cele 25 de tulpini de *E.coli* de origine umană analizate fiind asociat cu prezența FIA/FIB/K/N/F și a genelor *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} și *bla*_{qnrB}.

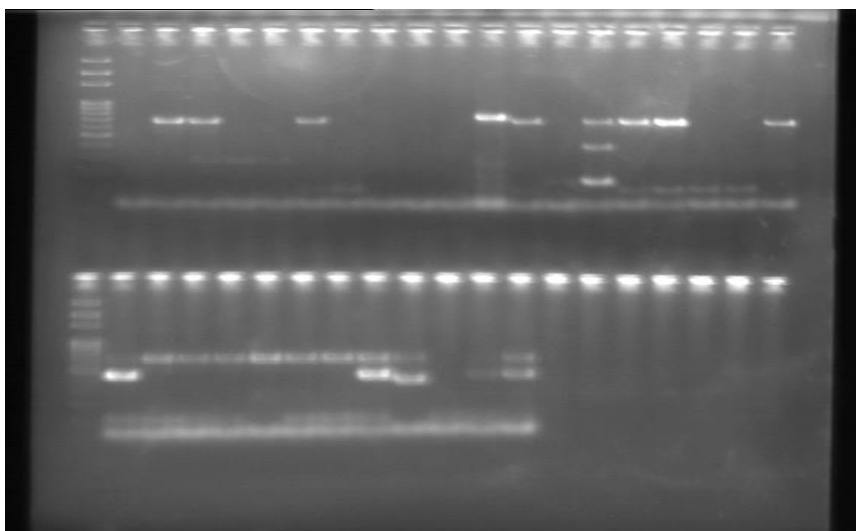
Plasmida IncA/C este asociată frecvent cu transmiterea genei *bla*_{CIT-M} (Carattoli, 2009). În studiul nostru plasmida IncA/C a fost identificată la o singură tulpină bacteriană de origine animală, substratul molecular al acesteia fiind caracterizat prin prezența genelor *bla*_{TEM} și *bla*_{CIT-M}.

Din totalul de 78 tulpini analizate, în urma investigațiilor noastre cu scopul de a caracteriza profilul plasmidic, 5 izolate ce prezentau gene de rezistență au avut profilul plasmidic netipabil prin tehnica PBRT.

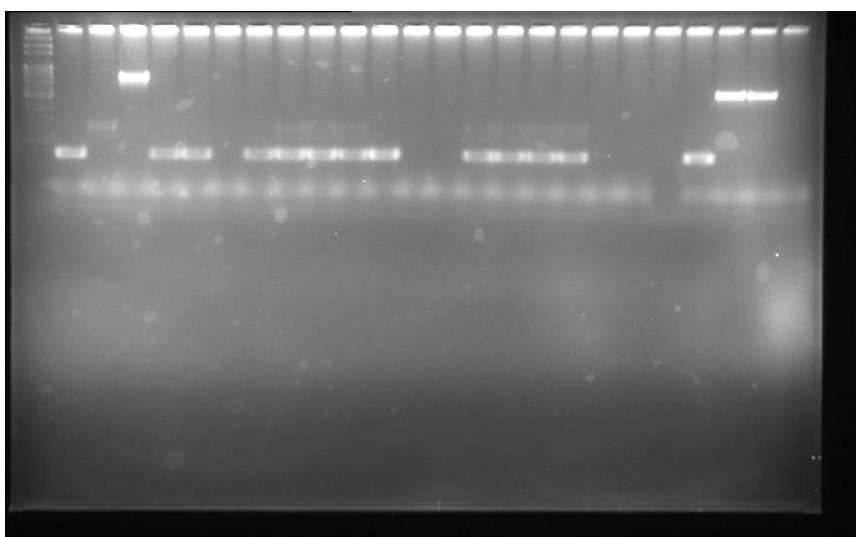
Rezultatele prezentate anterior și obținute în urma investigațiilor noastre pe întreg lotul de tulpini analizate sunt prezentate sintetic în fig.5.10., tabelul 5.11. și tabelul 5.12.



a) PBRT I realizat pentru tulpinile analizate



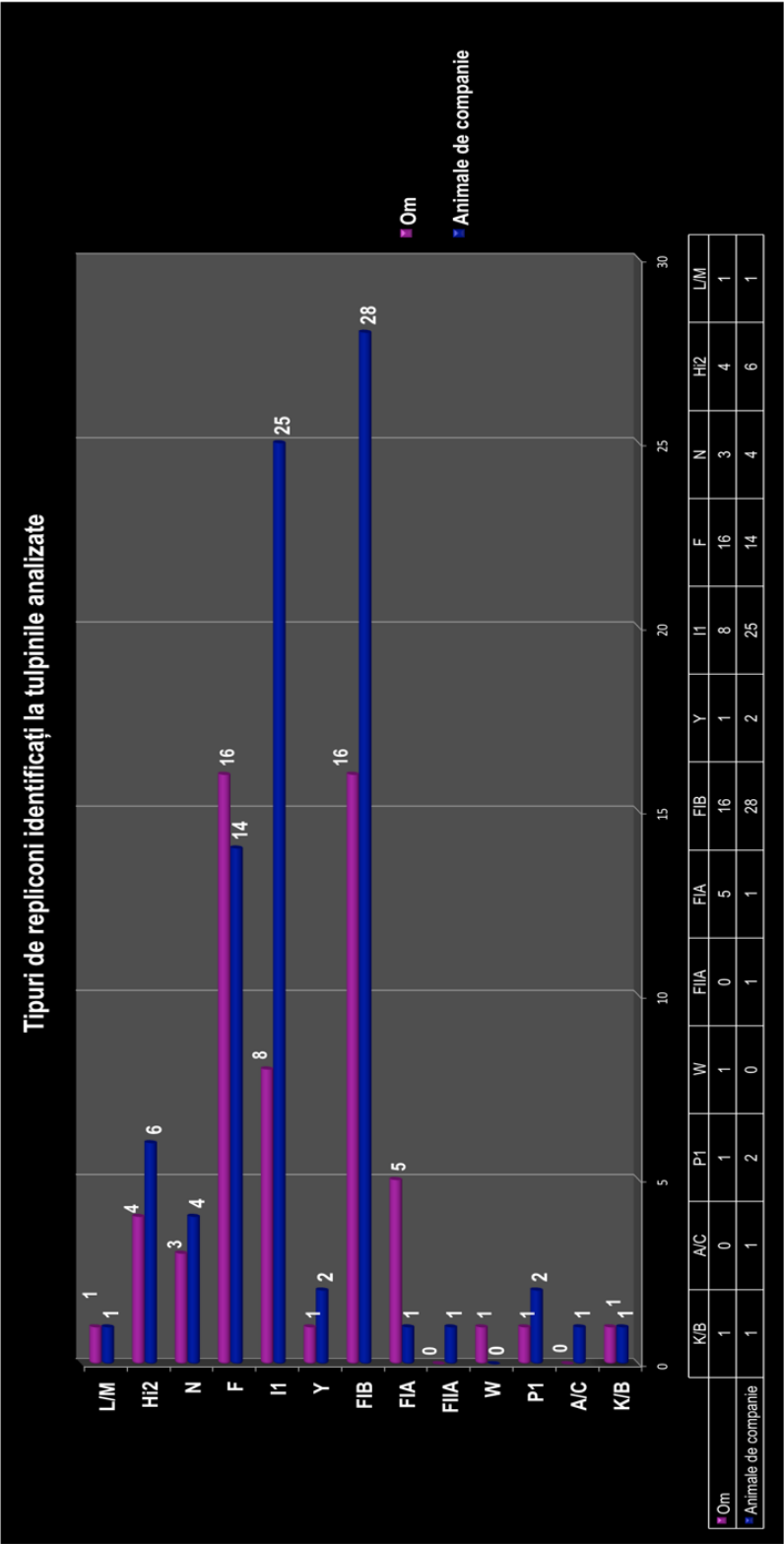
b) PBRT II realizat la tulpinile analizate



c)PBRT III realizat la tulpinile analizate

Fig.5.9. Cele 3 PBRT realizate pentru tulpinile analizate (a;b;c)

Fig.5.9. The 3 PBRTs for the analyzed strains (a; b; c)



Tabelul 5.11. / Table 5.11.

Rezultatele PBRT pentru tulpinile analizate
PBRT results for the strains analyzed

Nr. Crt.	Strains tested:	Isolated from:	Multiplex –inc/rep PCR (base pairs)																	
			Multiplex 1					Multiplex 2					Multiplex 3							
			B/O (159)	F/C (262)	A/C (465)	P1 (532)	T (750)	K/B (160)	W (242)	FI/AS (270)	F/IA (462)	F/B (702)	Y (765)	I1 (139)	F (270)	X (376)	HI1 (471)	HI2 (644)	N (559)	L/M (785)
MV1	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV3	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MV4	E. coli	animal	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
MV9	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV13	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV14	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MV15	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MV16	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV17	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV18	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV19	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV20	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV21	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV22	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV29	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MV30	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MV31	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
MV33	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MV34	-	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV37	E. coli	animal	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV38	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MV39	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MV40	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabelul 5.11. (continuare) / Continue of table 5.11.

Nr. Crt.	Strains tested:	Isolated from:	Multiplex –inc/rep PCR (base pairs)													Multiplex 3				
			Multiplex 1					Multiplex 2								Multiplex 3				
			B/O (159)	F/C (262)	A/C (465)	P1 (532)	T (750)	K/B (160)	W (242)	FIIAS (270)	FIA (462)	FIB (702)	Y (765)	H (739)	F (270)	X (376)	H/I (471)	N (559)	H/I2 (644)	L/M (785)
MV1	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV43	E. coli	animal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV46	E. coli	animal	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MV47	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MV48	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV49	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV50	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV51	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV52	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV53	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV54	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV55	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MV56	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV57	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV58	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV59	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV60	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV61	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV62	E. coli	animal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV63	E. coli	animal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV66 purple	E. coli	animal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV66	E. coli	animal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV66	E. coli	animal	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabelul 5.11. (continuare) / Continue of table 5.11.

Nr. Crt.	Strains tested:	Isolated from:	Multiplex –inc/rep PCR (base pairs)																	
			Multiplex 1					Multiplex 2					Multiplex 3							
			B/O (159)	FIC (262)	A/C (465)	P1 (532)	T (750)	K/B (160)	W (242)	FIIAS (270)	FIA (462)	FIB (702)	Y (765)	I1 (139)	F (270)	X (376)	H11 (471)	N (559)	H12 (644)	L/M (785)
MV1	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV67 inchis	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
MV67	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MV68	-	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV68	-	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV69	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MV71	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
MV71 purple	-	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV71 kleb	-	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV73	E. coli	animal	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MV1P	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MV3P	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MV4P	-	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MV4P kleb	-	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MV5P	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MV10P	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MV11P	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MV11P inchis	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
MV12P	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
MV12P purple	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-

Tabelul 5.11. (continuare) / Continue of table 5.11.

Nr. Crt.	Strains tested:	Isolated from:	Multiplex –inc/rep PCR (base pairs)																			Multiplex 3					L/M (785)
			Multiplex 1					Multiplex 2														X (376)	H1 (471)	N (559)			
			B/O (159)	F/C (262)	A/C (465)	P1 (532)	T (750)	K/B (160)	W (242)	F/IAS (270)	F/IA (462)	F/IB (702)	Y (765)	I1 (139)	F (270)	X (376)	H1 (471)	N (559)	H12 (644)								
MV1	E. coli	animal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV14P	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-						
MV14P lac+	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-						
MV16P	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
MV17 P	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-						
MV18p	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-						
MV18P purple	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-						
MV19P	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV19P inchis	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV20P pink	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV20P purple	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV21 P	E. coli	human	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV22P	E. coli	human	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						
MV23P	E. coli	human	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
MV24P	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+						
MV26P	E. coli	human	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-						

Tabelul 5.12. / Table 5.12.

Profilul plasmidic și genele de rezistență identificate pentru tulpinile analizate

Plasmid profile and resistance genes identified for the analyzed strains

Sursa	Nr. izolate (n)	Gene de rezistență asociate				Profilul plasmidic
		Tip CTX-M	TEM/SHV/OXA	AmpC	QnrA/QnrB/QnrS Aac-(6')-ib-cr	
animale	3	CTX-M-9	-	-	-	FIB/I1
animale	4	CTX-M-9	TEM	-	-	FIB/I1
animale	1	-	TEM	-	-	FIB/I1
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	FIB/I1
animale	3	CTX-M-1	-	-	QnrB	FIB/I1
om	1	CTX-M-1	-	-	-	FIB/I1
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	FIB/Y/N/I1/P1
animale	1	-	TEM/SHV	-	Aac-(6')-ib-cr	FIB
animale	3	CTX-M-1	-	-	QnrS	FIB
animale	1	-	TEM	-	-	FIB
animale	1	CTX-M-9	TEM	-	-	FIB
om	1	CTX-M-1	-	-	QnrS	FIB
animale	1	-	TEM	-	-	FIB/Y/FIA
animale	1	-	TEM/SHV/OXA	-	-	FIB/N/F
animale	1	-	TEM	-	-	FIB/F
animale	1	CTX-M-1	-	-	-	FIB/F
animale	1	-	-	-	Aac-(6')-ib-cr	FIB/F
om	2	-	TEM	-	-	FIB/F
om	1	CTX-M-U nd	-	-	-	FIB/F
animale	1	CTX-M-9	-	-	-	FIB/K/I1
animale	1	CTX-M-1	-	-	-	FIB/N
animale	1	CTX-Mu nd	-	-	-	FIB/N
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	FIB/F/I1
om	3	CTX-M-9	TEM	-	-	FIB/F/I1
om	2	CTX-M-1	TEM	-	-	FIB/F/I1
om	1	-	TEM/SHV	-	QnrB	FIB/FIA/W/K/N/F
om	1	-	TEM/OXA	-	-	FIB/FIA/F
om	1	-	OXA	-	QnrS/ Aac-(6')-ib-cr	FIB/FIA/F
om	1	CTX-M-9	-	-	-	FIB/FIA/F
om	1	-	OXA	-	Aac-(6')-ib-cr	FIB/FIA/F
om	1	CTX-M-1	TEM	-	-	FIB/FIA/ L/M

Tabelul 5.12. (continuare) / Continue of table 5.12.

Sursa	Nr. izolate (n)	Gene de rezistență asociate				Profilul plasmidic
		Tip CTX-M	TEM/SHV/OXA	AmpC	QnrA/QnrB/QnrS Aac-(6')-ib-cr	
animale	1	CTX-M-1	TEM/SHV	-	-	FIIA/ L/M
om	1	CTX-M-1	TEM	-	-	Y/I1
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	F/I1
animale	7	CTX-M-1	-	-	-	F/I1
om	1	-	TEM/SHV	-	-	F/I1
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	I1
animale	1	CTX-M-1	TEM	-	QnrS	I1
animale	6	CTX-M-1	-	-	QnrS	Hi2
animale	1	-	TEM/SHV		QnrA/ Aac-(6')-ib-cr	Hi2
om	1	-	-	-	QnrS	Hi2
om	2	CTX-M-1	-	-	QnrS	Hi2
om	1	-	SHV	-	-	N
animale	1	-	TEM/SHV	-	-	N
animale	1	-	TEM	CIT-M	-	A/C
animale	1	CTX-M-1	TEM	-	QnrS	P1/FIB/F
om	1	-	TEM	-	-	P1

*nd= tip de secvență nedeterminată

5.3.4. Experimentul de conjugare.

Au fost supuse experimentului de conjugare 16 tulpini de *E.coli* CTX-M pozitive (12 de origine animală și 4 de origine umană). Metoda prin care s-a realizat experimentul a fost conjugarea în bulion nutritiv utilizând o tulpină de *E. coli* K12 rezistentă la acidul nalidixic.

Selectarea izolatelor pentru realizarea experimentului a avut la bază următoarele considerente: prezența genelor *bla*_{CTX-M} și sensibilitatea tulpinilor bacteriene la acidul nalidixic.

După cultivarea în bulion după metoda descrisă la subsubcapitolul 5.2.1., s-au obținut colonii pe agar nutritiv suplimentat cu cefotaxim și acid nalidixic pentru 15 tulpini din cele 16 analizate inițial.

Atât pentru tulpinile donatoare cât și pentru transconjugăți a fost determinat profilul de rezistență la beta-lactami, fluorochinolone, tetracicline, sulfonamide și aminoglicozide. De asemenea, pentru transconjugății obținuți s-a urmărit confirmarea fenotipică a enzimelor de tip ESBL prin metoda discurilor combinate.

Cele 15 izolate obținute în urma conjugării au fost testate prin PCR cu scopul de a identifica gena *bla*_{CTX-M}. În urma investigațiilor gena menționată anterior a fost pusă în evidență la toți cei 15 transconjugăți.

Identificarea plasmidelor implicate în procesul de transfer al genelor de la tulpina donatoare la tulpina receptoare s-a realizat prin tehnica PBRT pentru toți cei 15 transconjugăți. Repliconii implicați cel mai frecvent în transmiterea genelor *bla*_{CTX-M} au fost Hi2 și I1, în literatura de specialitate existând studii similare care susțin rolul și implicațiile plasmidelor amintite anterior în diseminarea genelor *bla*_{CTX-M} la animalele de companie.

În urma investigațiilor realizate, gena *bla*_{CTX-M-1} a fost transmisă la toți cei 12 transconjugăți de origine animală și doar la 3 dintre transconjugății de origine umană, ceea ce înseamnă că transferul de gene a fost pozitiv pentru 15 din cele 16 tulpini supuse experimentului. De asemenea pentru toți transconjugății pe lângă transferul genei *bla*_{CTX-M-1} au fost transmiși și markerii de rezistență la alte clase de antibiotice (*bla*_{SHV}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{qnrB}) ce caracterizau tulpinile donatoare.

Rezultatele experimentului de conjugare au fost sintetizate în tabelul 5.13.

Tabel 5.13. / Table 5.13.

Rezultatele experimentului de conjugare pentru izolatele de E.coli CTX-M pozitive, sensibile la acid nalidixic
Conjugation Experiment results for E.coli producing CTX-M and susceptible to nalidixic acid

Izolat	Sursă	DD*	Profil de rezistență la antibiotice	Tip CTX-M	Gene de rezistență asociate	Profil plasmidic
MV18	animal	+	AMP, AMC, C, SXT, ATM, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrS	H2
MV18c		+	AMC, SXT, T, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrS	H2
MV19	animal	+	AMP, AMC, C, SXT, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrS	H2
MV19c		+	AMP, C, SXT, T, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrS	H2
MV21	animal	+	AMP, AMC, C, SXT, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrS	H2
MV21c		+	AMP, C, ENR, SXT, ATM, T, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrS	H2
MV22	animal	+	AMP, AMC, C, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrS	H2
MV22c		+	AMP, C, ENR, ATM, T, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrS	H2
MV46	animal	+	AMP, AMC, ATM, T, CTX, CPD	CTX-M-1	-	FIB/F
MV46c		+	AMP, ENR, ATM, T, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	-	FIB/F
MV47	animal	+	AMP, AMC, CN, ATM, CAZ, CTX, CPD	CTX-M-1	TEM/SHV	L/M; FIIA
MV47c		+	AMP, AMC, C, CN, ENR, ATM, T, CAZ, CTX, CPD, FOX, NA	CTX-M-1	TEM/SHV	L/M; FIIA
MV48	animal	+	AMP, AMC, ATM, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrB	FIB/I1
MV48c		+	AMP, ATM, T, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrB	I1
MV49	animal	+	AMP, AMC, ATM, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrB	FIB/I1
MV49c		+	AMP, ENR, ATM, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrB	I1
MV51	animal	+	AMP, AMC, ATM, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrB	FIB/I1
MV51c		+	AMP, ENR, ATM, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrB	I1
MV52	animal	+	AMP, AMC, CTX, CPD	CTX-M-1	-	FIB/I1
MV52c		+	AMP, ENR, ATM, CAZ, CTX, CPD, CPD, NA	CTX-M-1	-	I1
MV53	animal	+	AMP, AMC, ATM, CTX, CPD	CTX-M-1	-	F/I1
MV53c		+	AMP, ENR, ATM, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	-	I1
MV54	animal	+	AMP, AMC, ATM, CTX, CPD	CTX-M-1	-	F/I1
MV54c		+	AMP, AMC, ENR, ATM, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	-	I1
MV14P	om	+	AMP, C, ENR, SXT, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrB	H2
MV14Pc		+	AMP, AMC, C, ENR, SXT, ATM, T, CAZ, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrB	H2
MV14P lact+	om	+	AMP, C, CN, ENR, SXT, T, CTX, CPD	CTX-M-1	QnrS	H2
MV14P lact+ c		+	AMP, AMC, C, ENR, SXT, ATM, T, CAZ, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	QnrS	H2
MV24P	om	+	AMP, CN, CTX, CPD	CTX-M-1	-	FIB/FIA; L/M
MV24P c		+	AMP, AMC, CN, ENR, CAZ, SXT, ATM, CTX, CPD, NA	CTX-M-1	-	L/M

*DD- fenotip ESBL

5.4. Concluzii parțiale

1. La izolatele de origine animală, predomină genotipul ESBL CTX-M, predominant fiind grupul de enzime CTX-M-1 (70,59%).
2. Pentru izolatele de origine umană a fost identificată mai frecvent gena *bla*_{TEM}, urmată ca frecvență de gena *bla*_{CTX-M-U} (*bla*_{CTX-M-1} fiind grupul predominant 56,28%).
3. În urma secvențierii, atât pentru tulpinile de origine umană, cât și pentru tulpinile de origine animală, genele dominante identificate au fost *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} și *bla*_{CTX-M-1}.
4. Tulpini caracterizate molecular prin prezența genelor AmpC au fost identificate doar la animale, gena *bla*_{CIT-M} fiind singura izolată în procent de 1,23 din totalul de 81 de tulpini de origine animală analizate.
5. Tulpinile producătoare de ESBL confirmate molecular au fost pozitive și la markerii de rezistență la alte clase de antibiotice cum ar fi fluorochinolonele.
6. Rezultatul negativ obținut în urma screening-ului de gene ce codifică enzimele ESBL pentru tulpinile care nu au fost confirmate fenotipic prin medota discurilor combinate, nu infirmă prezența acestor gene ci este posibil ca acestea să fie dispuse la nivel cromozomial și nu plasmidic sau posibil să fie caracterizate de prezența altor markeri ESBL ne testați în prezentul studiu.
7. Din grupul genelor *bla*_{qnr}, atât la izolatele de origine animală cât și la cele de origine umană, gena *bla*_{qnrS} a fost predominantă (13,58% pentru animale, respectiv 13,89% pentru om).
8. Screening-ul molecular realizat pentru detecția genelor caracteristice rezistenței la colistin (*bla*_{mcr-1} și *bla*_{mcr-2}) a fost negativ.
9. În urma investigațiilor PBRT cu scopul de a caracteriza profilul plasmidial al tulpinilor analizate, repliconii IncF, IncI1, IncFIB și IncHi2 au avut frecvența cea mai crescută atât la tulpinile de origine umană cât și la cele de origine animală.
10. La o parte din tulpinile analizate (5/78) profilul plasmidic nu a putut fi determinat prin tehnica PBRT.
11. Plasmida IncA/C a fost identificată doar de la tulpina de origine animală caracterizată molecular de prezența genei AmpC *bla*_{CIT-M}.
12. La cele mai multe dintre tulpinile analizate prin tehnica PBRT au fost identificați repliconi multipli.
13. Experimentul de conjugare a fost reușit pentru 15 din cele 16 tulpini selectate.
14. În urma experimentului de conjugare s-a constatat că plasmidele cel mai frecvent implicate în procesul de transfer de material genetic au fost cele din grupul Hi2 și I1.

CAPITOLUL VI. DETERMINAREA GRADULUI DE OMOLOGIE GENETICĂ ÎNTRE TULPINILE PRODUCĂTOARE DE ESBL DE ORIGINE ANIMALĂ ȘI UMANĂ

CHAPTER VI. DETERMINATION OF DEGREE OF GENETIC HOMOLOGY BETWEEN POSITIVE ESBL STRAINS ISOLATED FROM ANIMAL AND HUMAN

În ultimii ani interesul comunității științifice pentru implicațiile rezistenței microbiene în sănătatea publică precum și circulația organismelor rezistente între animalele de companie și om a avut un trend ascendent. Dintre animalele de companie, câinii și pisicile trăiesc în imediata proximitate a omului, iar contactul direct între aceștia crește posibilitatea transmiterii bacteriilor rezistente între aceste specii gazdă. De asemeni, capacitatea bacteriilor de a transfera elemente genetice care conferă rezistență multiplă crește riscul și implicațiile contactului direct dintre animale și om.

Portajul fecal cu enterobacterii rezistente, în special cu tulpini de *Escherichia coli* la animalele de companie, poate fi considerat o potențială amenințare de infecție pentru populația umană. Obiectivul principal pentru acest capitol a fost de a stabili gradul de înrudire genetică a tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie cu cele izolate de la proprietari sau personalul sanitar veterinar. În acest sens a fost realizată încadrarea în grupurile filogenetice, în grupul clonal și de asemeni a fost analizat profilul RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) al tulpinilor izolate în urma screening-ului ESBL.

6.1. Material și metodă

6.1.1. Încadrarea în grupuri filogenetice

Studii filogenetice asemănătoare ale tulpinilor de *E. coli* au arătat că există patru grupe filogenetice principale: A, B1, B2 și D (Selander ș.a., 1987; Herzer ș.a., 1990), unde tulpinile extraintestinale virulente fac parte din grupul B2 și D (Bingen ș.a., 1998; Picard ș.a., 1999; Johnson ș.a., 2000).

Încadrarea filogenetică a tulpinilor de *E.coli* are aplicații practice, existând o strânsă legătură între grupul filogenetic din care fac parte și virulența tulpinilor testate.

Identificarea filogrupurilor s-a realizat prin tehnica PCR multiplex, iar interpretarea rezultatelor s-a realizat conform schemei realizate de către Clermont (Clermont ș.a., 2000).

Cei 3 primeri utilizați sunt caracteristici pentru genele *bla_{ChuA}*, *bla_{YjaA}* și fragmentul de ADN cromozomial TspE4.C2. Gena *bla_{ChuA}* este necesară pentru transportul hemului în cazul infecțiilor cu tulpina *E. coli* enterohemoragică O157:H7, iar gena *bla_{YjaA}* a fost identificată ca făcând parte din genomul bacterian al tulpinilor de *E.coli* K12 și funcția sa este încă necunoscută (Blattner ș.a., 1997; Bonacorsi ș.a., 2000; Clermont ș.a., 2000).

În tabelele 6.1. și 6.2. sunt sintetizate datele cu privire la designul primerilor utilizați, lungimea ampliconilor precum și temperaturile specifice pentru fiecare etapă a PCR-ului. De asemenea figura 6.1. reprezintă o schemă pentru interpretarea rezultatelor așa cum precizează Clermont (Clermont ș.a.,2000).

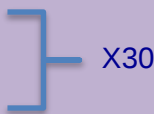
Tabelul 6.1. / Table 6.1.

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR multiplex pentru încadrarea în grupul filogenetic a tulpinilor de *E.coli*
Primer design and alignment temperatures used in multiplex PCR for assigning *E. coli* strains to the phylogenetic group

Primeri	Secvențele de nucleotide 5'-3'	Lungimea amplico- nului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
ChuA	Fw: 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' Rev: 5'-TGCCGCCAGTAC AAAGACA-3'	279	55°C	Clermont ș.a., 2000
YjaA	Fw: 5'-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCT G-3' Rev: 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211		
TspE4. C2	Fw: 5'-GAGTAATGTCTCGGGGCATTCA-3' Rev: 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152		

Tabelul 6.2. / Table 6.2.

Condițiile de amplificare PCR pentru identificarea genelor pe baza cărora se realizează încadrarea tulpinilor de *E.coli* în filogrupuri
PCR amplification conditions for identifying genes based on which *E. coli* strains are assigned to phylogruples

Gena	Condițiile	Referințe
Multiplex ChuA/ YjaA/ TSPE4C2	94°C- 5 minute 94°C- 30 secunde 55°C- 30 secunde 72°C- 30 secunde 72°C- 7 minute 	Clermont ș.a., 2000

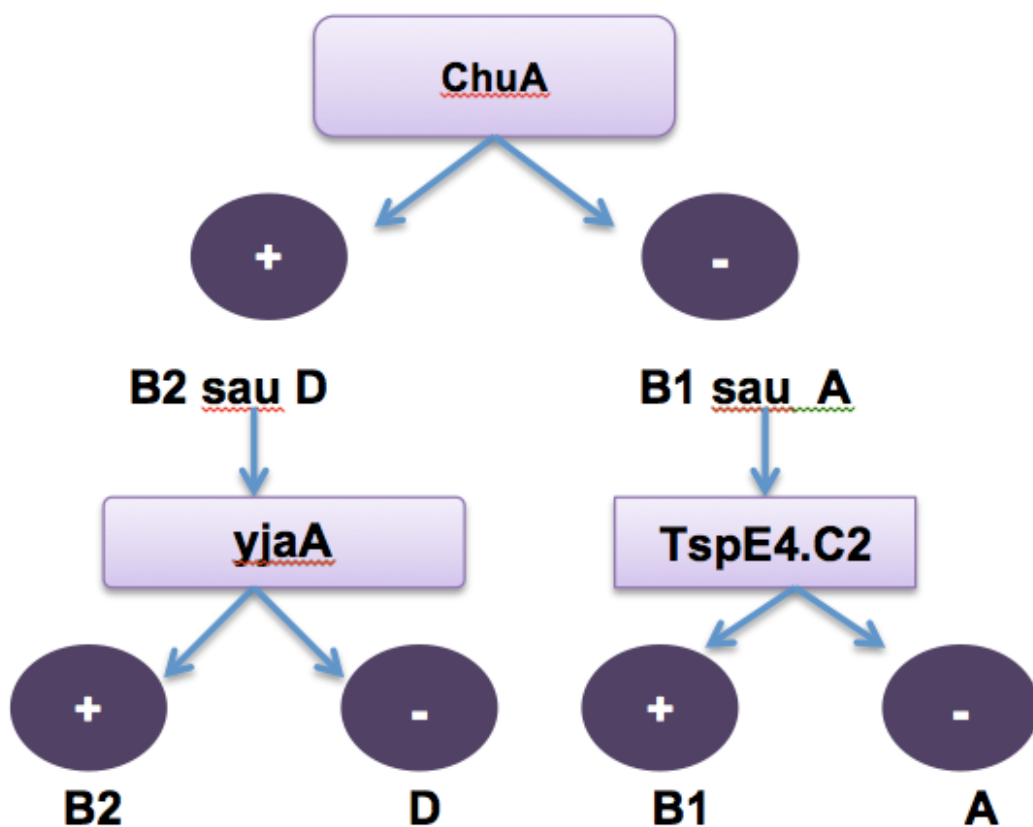


Fig.6.1. Schema pentru încadrarea în grupurile filogenetice a tulpinilor de *E. coli*
 Fig.6.1. Scheme for assigning *E. Coli* strains to phylogenetic groups
 (după Clermont ș.a.,2000)

6.1.2. Identificarea clonei O25-ST131

Epidemiologia tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins s-a schimbat foarte mult în ultimii ani, odată cu identificarea tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL din grupul CTX-M izolate atât de la oameni cât și de la animale.

Tulpina de *E.coli* producătoare de enzime CTX-M-15, linia clonală ST131, serogrupul O25 este considerată pademică, face parte din grupul filogenetic B2 și are un potențial ridicat de virulență, fiind asociată frecvent cu infecțiile produse de bacterii „multidrug resistant”. Tulpini CTX-M-15 pozitive aparținând liniei genetice ST131:O25 au fost izolate în special de la oameni, însă cu o frecvență mai redusă și de la animale (Timofte ș.a., 2014).

În Marea Britanie a fost izolată o astfel de tulpină de la câine și a prezentat omologie genetică cu tulpinile CTX-M-15 grupul clonal ST131, serogrupul O25 de origine umană (Timofte ș.a., 2014). Omologia raportată de Timofte și col. susțin nevoia de supraveghere a portajului fecal cu tulpini

producătoare de ESBL la animalele de companie și caracterizarea cât mai exactă din punct de vedere molecular a enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins.

Identificarea serogrupului O25 la tulpinile de *E.coli* grupul filogenetic B2 s-a realizat prin PCR simplex, designul primerilor fiind redat în tabelul 6.3., iar condițiile de amplificare au fost prezentate schematic în tabelul 6.4. (Clermont ș.a., 2008).

Încadrarea în grupul clonal ST131 s-a realizat prin tehnica PCR multiplex. Protocolul de lucru a fost cel recomandat de Clermont și col. și a urmărit identificarea genelor *bla_{pabB}* și *bla_{trpA}* (tabelul 6.3. și tabelul 6.4.) (Clermont ș.a., 2009).

Tabelul 6.3. / Table 6.3.

**Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru
încadrarea în serogruupul O25 și grupul clonal ST131
Primer design and alignment temperatures used for
O25-ST131 clonal group PCR**

Primeri	Secvențele de nucleotide 5'-3'	Lungimea amplico- nului (bp)	Tempera- tura de aliniere specifică	Referințe
O25	Fw (rfb.1bis): ATACCGACGACGCCGATCTG Rev (rfbO25b.r): ATACCGACGACGCCGATCTG	300	60°C	Clermont ș.a., 2008
Multipl ex ST131	trpA.F : 5' -GCTACGAATCTCTGTTTGCC-3' trpA2.R :5' -GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'	427	65°C	Clermont ș.a., 2009
	PabB F: 5' -TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3' PabB R: 5'-GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT-3'	347		

Tabelul 6.4. / Table 6.4.

Condițiile de amplificare PCR pentru identificarea serogrupului O25 și a grupului clonal ST131 pentru tulpinile de *E.coli* filogrupul B2
PCR amplification conditions for the O25-ST131 clonal group identification for *E. coli* strain B2

Gena	Condițiile	Referințe
O25	94°C- 5 minute 93°C- 10 secunde 60°C- 15 secunde 72°C- 10 secunde 72°C- 5 minute 	Clermont ș.a., 2008
Multiplex ST131	94°C- 4 minute 93°C- 5 secunde 65°C- 10 secunde 72°C- 10 secunde 72°C- 5 minute 	Clermont ș.a., 2009

6.1.3. Evaluarea gradului de înrudire genetică utilizând tehnica de amplificare randomizată a ADN-ului polimorfic (RAPD)

Diversitatea genetică și gradul de omologie al tulpinilor de izolate de noi în urma screening-ului ESBL au fost analizate prin tehnica RAPD, ce are la baza tehnica PCR simplex (Munday ș.a., 2004).

Designul primer-ului utilizat și condițiile de amplificare au fost prezentate în tabelul 6.5. și 6.6.

Tabelul 6.5. / Table 6.5.

Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la RAPD pentru analiza diversității genetice a tulpinilor de *E.coli*

Primer design and alignment temperatures used in RAPD to analyze the genetic diversity of *E. coli* strains

Primeri	Secvențele de nucleotide 5'-3'	Lungimea ampliconului (bp)	Temperatura de aliniere specifică	Referințe
ERIC 1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	300	36°C	Munday ș.a., 2004

Tabelul 6.6. / Table 6.6.

Condițiile de amplificare RAPD pentru analiza diversității genetice a tulpinilor de *E. coli*
RAPD amplification conditions for the analysis of the genetic diversity of *E. coli* strains

Gena	Condițiile	Referințe
ERIC 1	94°C- 3 minute 94°C- 1 minut 36°C- 1 minut 72°C- 2 minute 72°C- 5 minute } X45	Munday ș.a., 2004

6.2. Rezultate și discuții

6.2.1. Încadrarea în grupuri filogenetice

În acord cu literatura de specialitate, tulpinile de *E.coli* ce fac parte din flora comensală aparțin grupurilor filogenetice A și B1, în timp ce tulpinile de *E.coli* patogene extraintestinale sunt încadrate în grupurile filogenetice B2 și D (Coque ș.a., 2008; Carlos ș.a., 2010; Méric ș.a., 2013).

Toate tulpinile de *E.coli* (n=104) izolate în urma screening-ului ESBL atât de la animale cât și de la proprietari sau personalul sanitar veterinar au fost supuse identificării filogrupului din care fac parte.

Pentru tulpinile de origine animală au fost analizate 70 de izolate de *E.coli*, dintre acestea 28,57% (20/70) aparținând filogrupului A, 35,71% (25/70) filogrupului B1, 22,85% (16/70) filogrupului B2 și 12,87% (9/70) filogrupului D (fig.6.2. fig.6.3.).

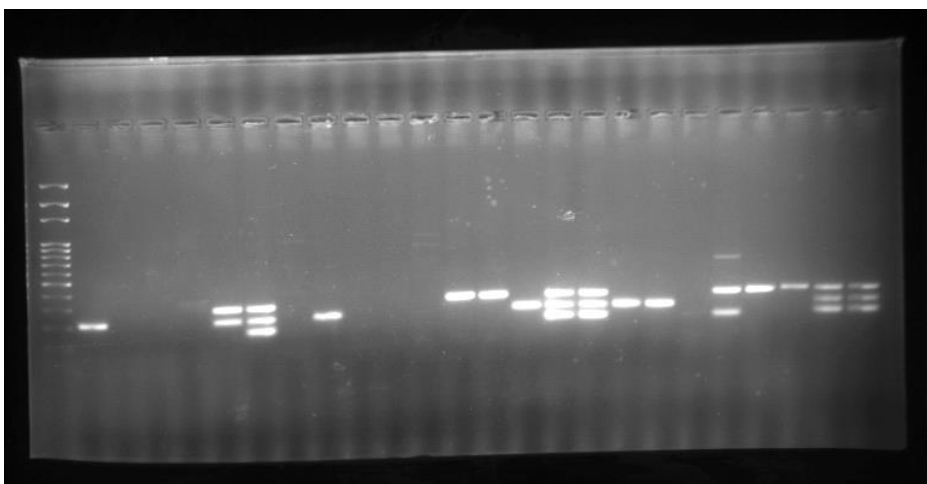


Fig.6.2. Încadrarea tulpinilor de *E.coli* în filogrupuri
 Fig.6.2. Assigning *E. coli* strains to phylogenetic groups

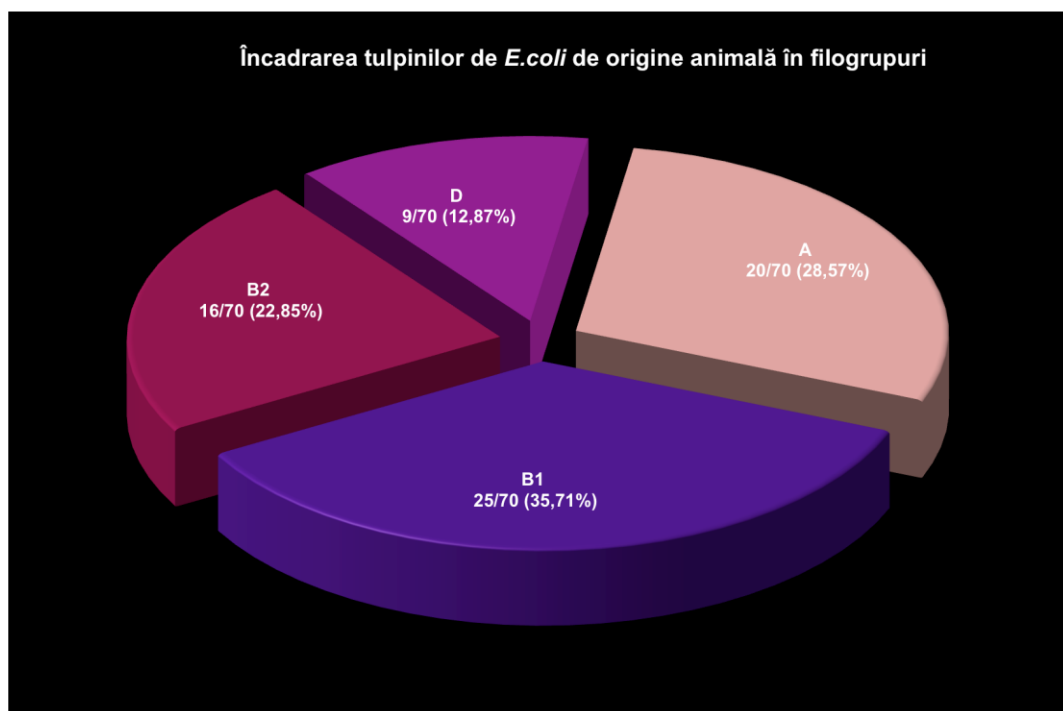


Fig.6.3. Grupurile filogenetice identificate la izolatele de *E.coli* de origine animală
 Fig.6.3. The phylogenetic groups identified in *E. coli* isolated from animals

În urma investigațiile realizate de noi cu scopul de a urmări distribuția grupurilor filogenetice la speciile gazdă au arătat că grupul cel mai prevalent la tulpinile de *E.coli* izolate de la animalele de companie a fost grupul filogenetic B1 (35,71%), urmat apoi de grupul A (28,57%). Pentru tulpinile fecale, această constatare este în concordanță cu studiile din literatura de specialitate care menționează că izolatele din tulpinile comensale, indiferent de repertoriul lor de rezistență fac parte din grupul A sau B1 (Tenaillon ș.a.,2010). Alte studii realizate pe segmente de subiecți similare cu cele analizate de noi, au observat o prevalență mai mare a grupului B2 (48,9%) pentru tulpini de *E.coli* izolate din materiile fecale ale câinilor sănătoși și ale proprietarilor acestora, în timp ce Damborg și colaboratorii au raportat ca fiind cel mai prevalent grupul A (32%) pentru tulpinile de origine umană și grupul B1(42%) pentru izolatele de origine animală (Damborg ș.a., 2009; Harada ș.a.,2012).

Analiza distribuției filogenetice a grupurilor de *E. coli* izolate de la proprietari și personalul sanitar veterinar a arătat că prevalența cea mai ridicată a fost înregistrată pentru grupul B2 (35,30%; 12/34 dintre izolate), urmat de grupul A (32,35%; 11/34 dintre tulpini), grupul D (29,41%; 10/34 dintre tulpini) și grupul B1 a cărei prevalență a fost cea mai scăzută (2,94%; 1/34 dintre tulpini) (fig.6.4.).

Literatura de specialitate menționează că tulpinile comensale fac parte din grupul A și B1, situație pe care ne așteptam să o raportăm și noi la izolatele de origine umană, luând în considerare că probele de materii fecale provin de la proprietari sau personal sanitar veterinar clinic sănătos. Filogrupul B2 în special, care predomină ca prevalență în studiul nostru și în mai mică măsură grupul D, care are de asemenea o prevalență destul de ridicată constituie o problemă de sănătate publică deoarece aceste tulpini au un caracter de patogenitate mai ridicat ce rezultă mai ales din asocierea mai multor caractere de virulență.

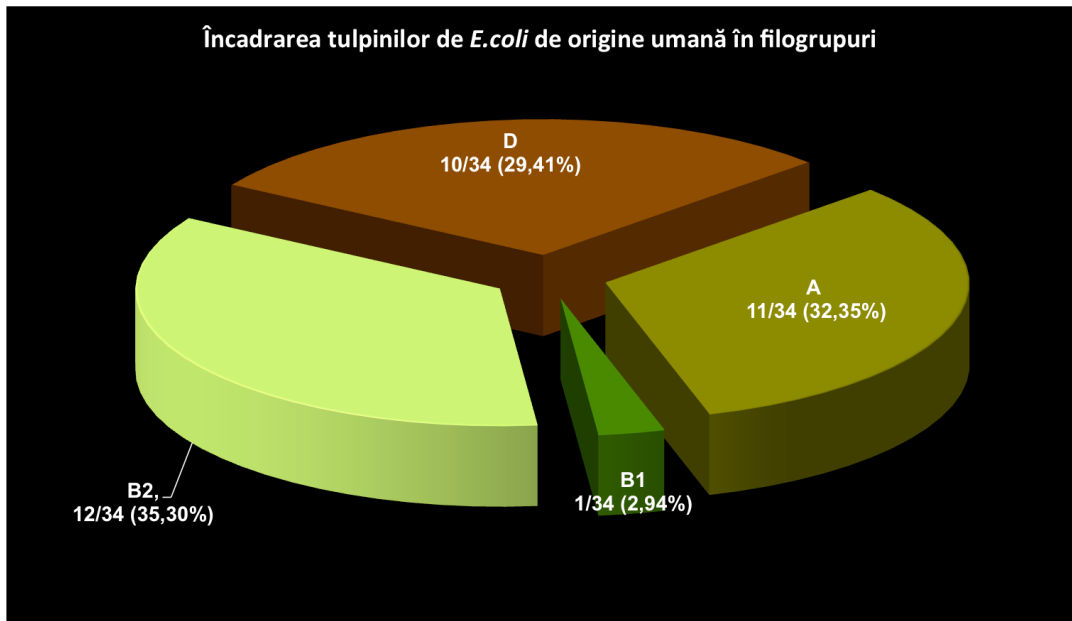


Fig.6.4. Grupurile filogenetice identificate la izolatele de *E.coli* de origine umană

Fig.6.4. The phylogenetic groups identified in *E. coli* isolated from humans

Tulpinile de *E.coli* care fac parte din grupul B2 și sunt izolate de la animale clinic sănătoase au un potențial risc zoonotic prin transmiterea la om prin contact direct. Situația poate fi mai periculoasă dacă virulența tulpinilor este asociată cu prezența genelor de rezistență la diferite clase de antibiotice.

Analiza grupurilor filogenetice la tulpinile de *E.coli* CTX-M pozitive, atât de origine umană cât și cele de origine animală (n=48 de tulpini) au arătat că grupul filogenetic predominant a fost grupul A (33,33%, 16/48), urmat de grupul B2 cu un procent de 27,1 (13/48) (majoritatea tulpinilor CTX-M pozitive din grupul B2 au fost de origine animală, 7/13), grupul D în proporție de 20,82% (10/48) și grupul B1 18,75% (9/48) (fig.6.5.)

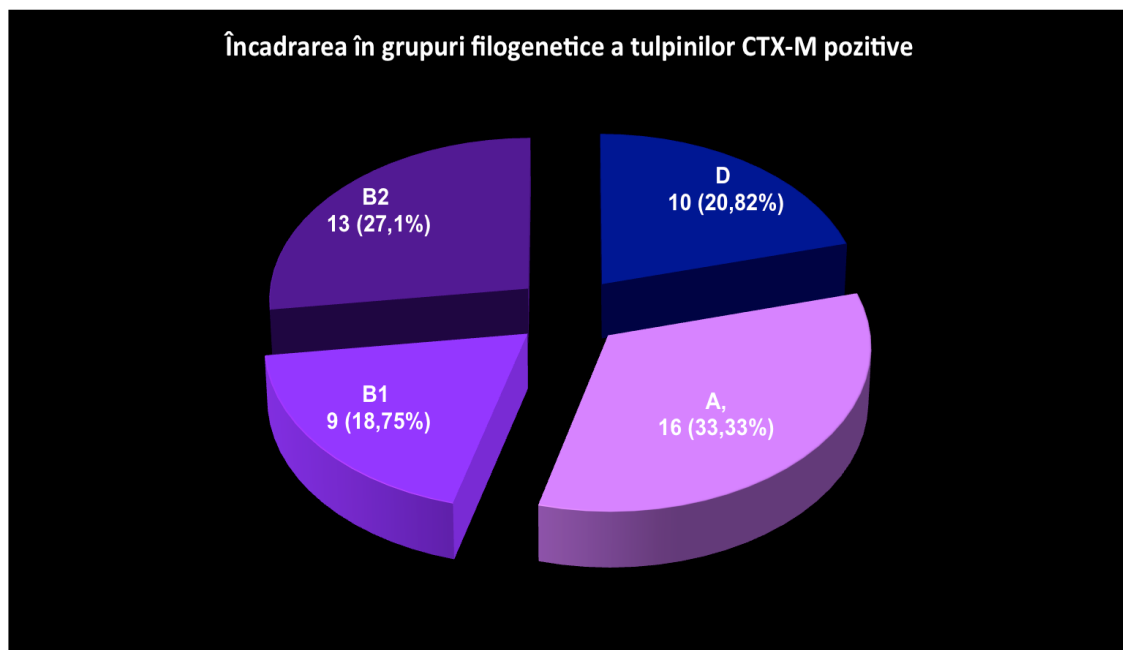


Fig.6.5. Spectrul grupurilor filogenetice identificate la tulpinile de *E.coli* CTX-M pozitive

Fig.6.5. Spectrum of phylogenetic groups identified in *E.coli* producing CTX-M

6.2.2. Identificarea clonei O25-ST131.

Tehnica de amplificare randomizată a ADN-ului polimorfic (RAPD) este descris de Williams și col. și este frecvent folosită pentru stabilirea diversității genetice a speciilor (Williams ș.a., 1990).

Este o tehnică ce are la bază o reacție PCR ce folosește un singur primer scurt format din 8-12 nucleotide ce se atasează aleatoriu în genomul analizat, doar de secvențele care prezintă omologie genetică. Spre deosebire de PCR-ul clasic, prin tehnica RAPD segmentele de ADN sunt amplificate aleatoriu.

Tulpinile de CTX-M-15 pozitive, grupul clonal ST131, serogrupul O25 (ST131-O25) sunt considerate tulpini pandemice, asociate cu multidrug rezistența și izolate cu o frecvență crescută din infecțiile bacteriene la om. Astfel de izolate au fost identificate și în medicina veterinară la animalele de companie (Pomba ș.a., 2009; Timofte ș.a., 2011).

De asemenea izolatele ST131-O25 sunt tulpini ce fac parte din grupul filogenetic B2 și pe lângă diseminarea genei *bla*_{CTX-M-15} sunt responsabile și de răspândirea genelor ce determină rezistența la fluoroquinolone (Clermont ș.a., 2009; Mora ș.a., 2010).

Au fost investigate pentru identificarea clonei ST131 și serogrupul O25 toate tulpinile de *E.coli* ce au făcut parte din grupul filogenetic B2, în total fiind analizate 28 de izolate (16 de origine animală și 12 de origine umană).

Analiza rezultatelor a arătat că pentru tulpinile de origine animală 1/16 (6,25%) a aparținut serogrupului O25, în timp ce pentru tulpinile de origine umană 3/12 (25%) au fost identificate ca aparținând serogrupului O25. De asemenea pentru încadrarea în grupul clonal ST131, 2/16 (12,5%) izolate de origine animală au fost pozitive, iar pentru tulpinile de origine umană au fost identificate tot 2/12 (16,66%) izolate ST131.

Corelând informațiile, din totalul de 28 de tulpini de *E.coli* filogrupul B2 analizate, 3 izolate au aparținut clonei O25-ST131, astfel:

- o tulpină de origine animală (de asemenea TEM pozitivă);
- două tulpini de origine umană, care au fost purtătoare a genelor *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6')-Ib-cr}, , respectiv *bla*_{CTX-M-9}.

Deși majoritatea tulpinilor de ST131 sunt serotipul O25:H4, în cazul izolatelor de origine animală, a fost identificată o tulpină ST131 la care nu a fost identificat serotipul O25, însă situații asemănătoare au mai fost raportate în literatura de specialitate, tulpinile ST131, serotipul O16 de exemplu, fiind izolate în țări precum Danemarca, Japonia, Australia, Spania sau Franța (Blanc ș.a., 2014; Dahbi ș.a., 2013; Matsumura ș.a., 2012; Olesen ș.a., 2013; Platell ș.a., 2011).

De asemeni deși literatura de specialitate menționează ca fiind mai frecvente tulpinile de *E.coli* CTX-M-15, O25 ST131, în cazul izolatelor analizate de noi, atât de origine umană cât și animală nu a fost identificată clona O25 ST131 la tulpini CTX-M-15 pozitive. În România, în arealul geografic analizat în prezentul studiu, alte cercetări au identificat tulpini de origine umană ST131-O25 ce au fost purtătoare de gene *bla*_{CTX-M-15} și gene de rezistență la fluoroquinolone (Măciucă ș.a., 2015).

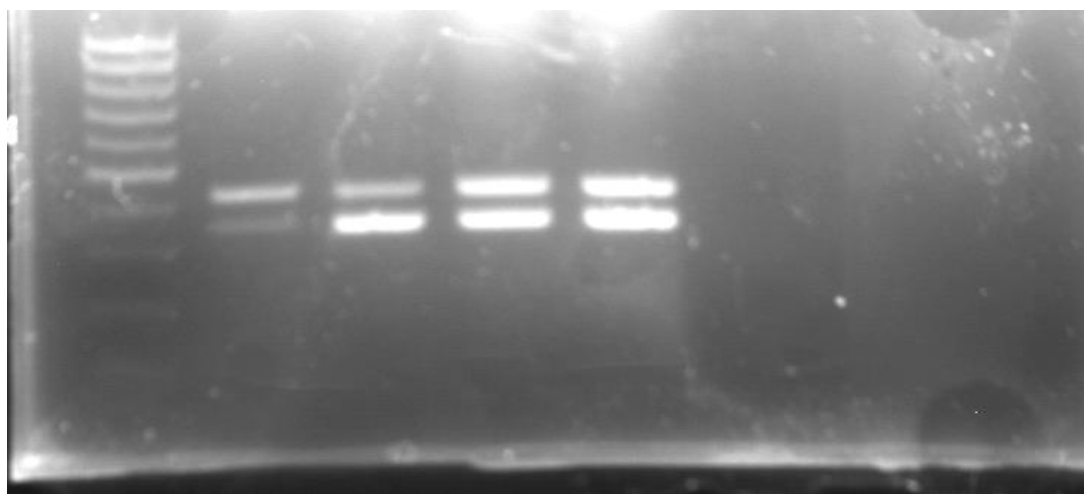


Fig.6.6. Rezultatele pentru izolarea grupului clonal ST131

Fig.6.6. Results for ST131 clonal group isolation

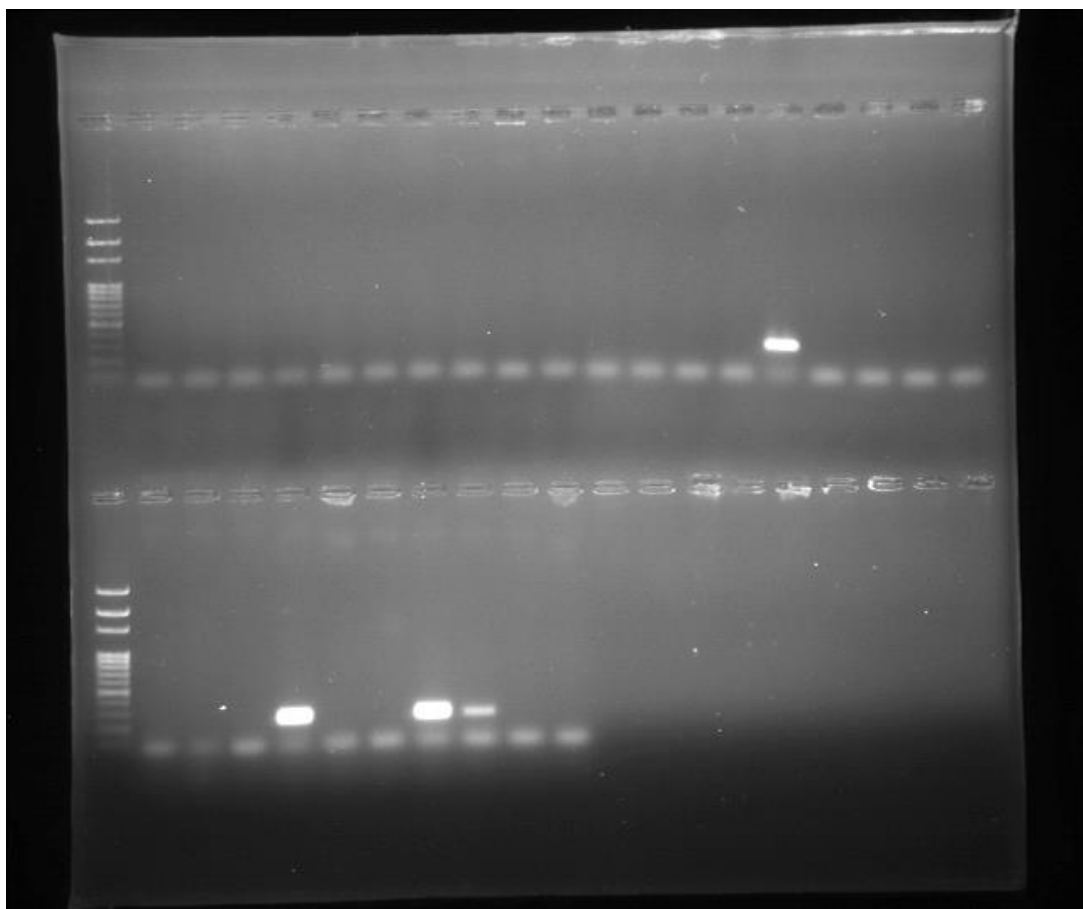


Fig.6.7. Rezultatele pentru izolarea serogrupului O25
Fig.6.7. Results for O25 serogroup isolation

6.2.3. Evaluarea gradului de înrudire genetică utilizând tehnica RAPD

Tehnica RAPD este frecvent utilizată pentru determinarea gradului de înrudire genetică. Așa cum am descris la subcapitolul 6.1.3, amplificarea randomizată a ADN-ului polimorfic (RAPD) are la bază o reacție PCR ce utilizează un singur primer scurt ce se atașează aleator în genom acolo unde găsește omologie genetică.

Rezultatele obținute cu ajutorul tehnicii RAPD au fost analizate prin intermediul softului CLIQS 1D Pro (www.totallab.com). Acest soft permite o abordare flexibilă și compararea automată a mai multor imagini obținute la electroforeză, rezultatul final fiind redat prin realizarea unei dendograme formată din diferite clustere ce conțin tulpini ce au în comun un anumit coeficient de similitudine. Softul are la bază algoritmul Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ce construiește clusterelor pe baza coeficientului de similitudine DICE, coeficient a cărei valoare a fost de 0,5. Tulpinile ale căror coeficient de similaritate a fost cuprins între 80-90% au fost considerate înrudite,

iar cele pentru care similaritatea a fost de 100% se consideră a fi identice și reprezintă aceeași clonă bacteriană (Goris ș.a., 2007).

Analiza rezultatelor la izolatele investigate a arătat o mare diversitate genetică atât atunci când s-au comparat izolatele de origine animală cu cele de origine umană, cât și când s-au comparat izolatele de origine umană între ele și cele de origine animală între ele.

Tulpini care au fost considerate înrudite ca urmare a coeficientului de similaritate cuprins între 80-90% au fost izolate atât de la animalele de companie cât și de la proprietari sau personalul sanitar veterinar, de exemplu între PDI-D58 și PAIR-3D (tulpină izolată de la câine padoc Iași / tulpină izolată de la câine cabinet veterinar Iași) sau PAIR5-D cu PDI-S1 (tulpină izolată de la câine cabinet veterinar/ tulpină izolată de la personal sanitar padoc Iași) sau PDT-D5 cu PDB-D99 (tulpină izolată de la câine padoc Tulcea/ tulpină izolată de la câine padoc Bârlad) (fig.6.9.).

Deși investigațiile RAPD au arătat o mare diversitate genetică, cu toate acestea s-au observat similarități de 100%, după cum urmează:

- a fost identificată aceeași clonă pentru o parte din tulpinile de *E.coli* izolate de la câinii din padocul din Iași (2 tulpini, PDI-D6 și PDI-D24), situație similară fiind întâlnită și în cazul izolatelor de la câinii de la padocul din Tulcea (3 tulpini, PDT-D28, PDT-D25, PDT-DD24) (fig.6.9.;).

- același profil molecular a fost identificat și în cazul a două tulpini bacteriene izolate din materiile fecale ale unor câini ce au provenit de la același cabinet (PAIR7-D, PAIR6-D), ceea ce sugerează că tulpina izolată este una întreținută de mediul comun al câinilor (fig.6.9.).

- situație similară cu cea întâlnită la izolatele de origine animală a fost înregistrată și în cazul tulpinilor de origine umană. Au fost identificate tulpini bacteriene cu profilul molecular comun între tulpinile izolate de la același proprietar: PDT-S1(I) și PDT-S1 sau 1-S și 1-S(1) sau de la același animal: PAIR36-D și PAIR36-D(I) (fig 6.9.).

Analizând gradul de omologie genetică dintre tulpinile izolate de la animale și de la proprietari, în urma investigațiilor s-a observat că există asemănări fenotipice și genotipice ce sugerează o relație clonală între izolatele menționate anterior (PAIR1-H, PAIR1-D1, PAIR1-D2) (fig.6.9.) Deși tulpinile izolate de la proprietari și animalele de companie, cu profil fenotipic și molecular similar nu sunt în număr mare, rezultatele obținute în acest studiu sugerează că animalele de companie pot fi un rezervor de bacterii producătoare de ESBL pentru proprietari. Mai mult decât atât identificarea unor plasmide comune pentru câini și proprietari, susțin transmiterea cu ușurință a genelor de rezistență între subiecții analizați în studiul nostru. De asemenea, în acest studiu s-a izolat aceeași clonă pentru tulpini de *E.coli* de origine umană (de la proprietari) de pe raza orașului Iași și de la animalele din padocul din Iași ceea ce sugerează

transmiterea acestor bacterii de la om la animale sau invers (PAIR22-H, PAIR22-H(I) și PDI-D4) (fig.6.9.).

Studii similare realizate pe același grup de subiecți, au demonstrat că animalele de companie purtătoare de tulpini bacteriene producătoare de ESBL constituie un factor de risc pentru transmiterea acestor tulpini la oameni (Ewersș.a., 2012). O altă dovadă care indică rolul pe care animalele de companie îl pot avea în infecțiile ESBL la om este reprezentată de identificarea anumitor clone de *E.coli* producătoare de ESBL (de exemplu CTX-M-15 ST648, CTX-M-15 ST131-O25) izolate atât de la animale cât și de la om (Carvalho ș.a.,2016; Ewers ș.a.,2012; Leistner ș.a., 2013; Ljungquist ș.a., 2016; Meyer ș.a., 2012.).

Prezența simultană a tulpinilor de enterobacterii cu rezistență multiplă la câini și proprietarii acestora, caracterizate prin profiluri fenotipice de rezistență la antibiotice asemănătoare și profiluri moleculare (gene ESBL, grupuri filogenetice și profilul RAPD) identice sau strâns legate, demonstrează grade ridicate de omologie și prin urmare un consum ridicat de antibiotice atât la om cât și la animale.

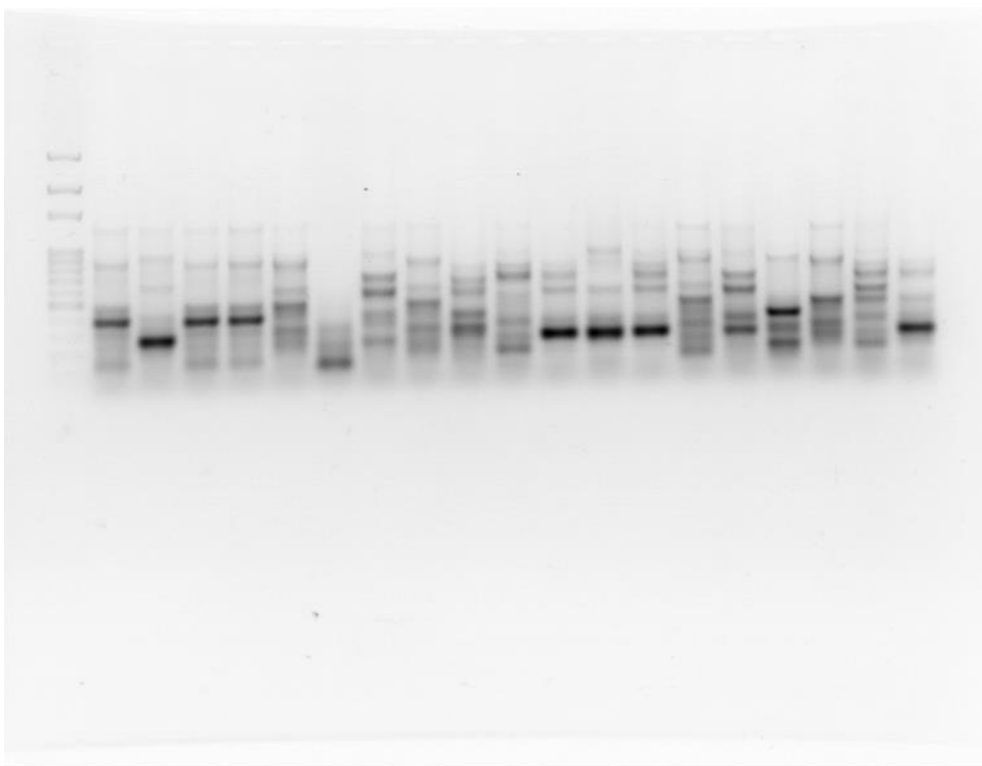


Fig.6.8. RAPD tulpini de *E.coli*

Fig.6.8. RAPD strains of *E. coli*

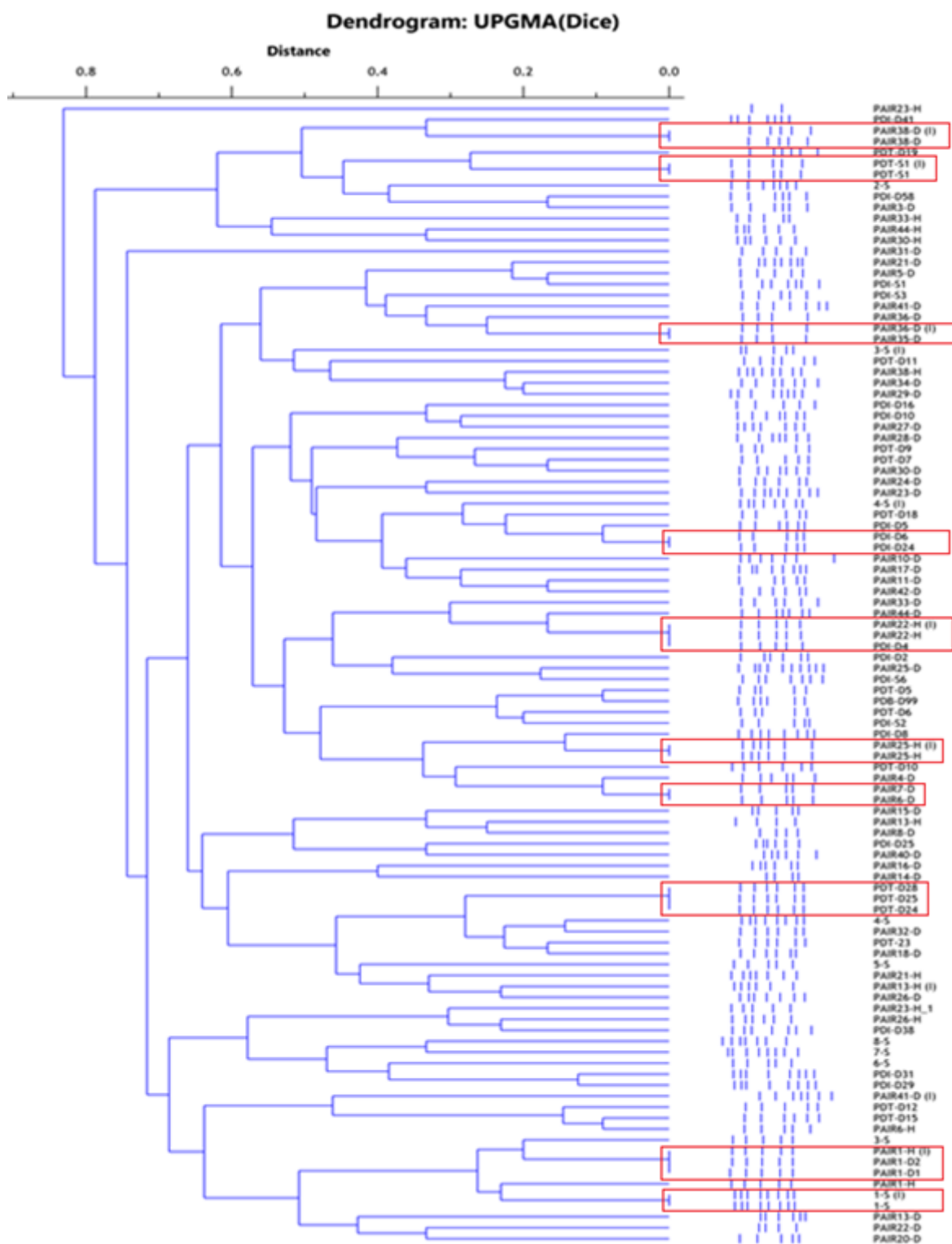


Figura 6.9. / Figure 6.9.

Fig.6.9. Dendograma rezultată în urma interpretării RAPD realizat pentru tulpinile de *E.coli* de origine umană și animală izolate în urma screening-ului ESBL și care prezintă profiluri similare de rezistență. Dendograma a fost construită folosind coeficientul de similaritate DICE (0.5) și metodele de grupare UPGMA. Gradul de similaritate este afișat pe bara de scală.

Fig.6.9. RAPD Dendogram showing the degree of genetic diversity for *E. coli* strains of human and animal origin isolated from ESBL screening. The dendogram was constructed using the DICE (0,5) similarity coefficient and UPGMA grouping methods. The degree of similarity is displayed on the scale bar.

Notă: PDI-D= câini padoc Iași

PDI-S= Personal sanitar-veterinar padoc Iași

PDB-D= câini padoc Bârlad

PDT-D= câini padoc Tulcea

PDT-S= Personal sanitar-veterinar padoc Tulcea

PAIR X-D/ PAIR X- H= pereche animal de companie/ proprietar (unde "X" este numărul)

X-S= Personal sanitar veterinar (unde "X" este numărul)

6.3.Concluzii parțiale

1. Grupul filogenetic predominant pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la animale a fost B1 (35,71%).

2. Pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la proprietari sau personalul sanitar veterinar, grupul filogenetic predominant a fost B2 (35,30%). Portajul fecal cu tulpini din acest grup constituie o problemă de sănătate publică, aceste izolate având un caracter de patogenitate ridicat ce rezultă mai ales din asocierea mai multor caractere de virulență.

3. Majoritatea tulpinilor de *E.coli* CTX-M pozitive au aparținut grupului filogenetic A.

4. Au fost izolate 3 tulpini de *E.coli* ST131-O25: o tulpină de origine animală, caracterizată molecular prin prezența genei *bla*_{TEM} și două tulpini de origine umană al căror substrat molecular a fost reprezentat de genele *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6')-Ib-cr} și respectiv *bla*_{CTX-M-9}.

5. Investigațiile RAPD au pus în evidență o mare diversitate genetică între tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană și tulpinile de origine animală comparate cu cele de de origine umană.

6. Au fost identificate tulpini de origine animală izolate de la câinii din padocuri sau de la cabinete, caracterizate prin substrat fenotipic și molecular identic sau asemănător ceea ce indică o relație clonală între aceste tulpini și de asemenea că mediul comun al animalelor de la care au fost izolate joacă un rol important în transmiterea acestor tulpini.

7. Au fost identificate tulpini de *E.coli* cu similaritate de 100% de la câine și proprietari, caracterizate prin profiluri fenotipice și genotipice identice (gene ESBL, grup filogenetic identic, același profil RAPD), ceea ce sugerează că animalele de companie pot constitui un rezervor de bacterii producătoare de ESBL pentru om, genele de rezistență fiind transmise cu ușurință între animale și proprietari prin contactul direct sau indirect.

CAPITOLUL VII. CONCLUZII FINALE, LIMITELE STUDIULUI ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE

1. În urma screening-ului ESBL pe mediul selective cromogen, din cele 279 de probe de materii fecale testate au fost obținute 117 (41,93%) tulpini de enterobacterii, majoritatea aparținând specie *Escherichia coli* (88,89%), urmate de *Klebsiella pneumoniae* (5,98%) și *Proteus spp.* (5,13%).

2. Tulpinile bacteriene izolate în urma screening-ului ESBL au fost confirmate fenotipic prin metoda discurilor combinate în proporție de 53,84% (63/117 tulpini).

3. Testarea sensibilității la alte clase de antibiotice a tulpinilor confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL s-a realizat prin metoda difuzimetrică, fiind determinată sensibilitatea la 9 antibiotice din 7 clase diferite: beta-lactamine, fluorochinolone, aminoglicozide, tetraciclone, sulfonamide, carbapeneme, fenicoli.

4. Investigațiile privind rezistența la alte clase de antibiotice a izolatelor confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL, au pus în evidență un grad ridicat de rezistență multiplă la antibiotice (92,85% pentru tulpinile de origine animală și 90,47% pentru izolatele de origine umană).

5. Spre deosebire de tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană au prezentat un nivel crescut al sensibilității la acțiunea amoxicilinei/acid clavulanic.

6. Toate cele 63 de tulpini prezumtiv ESBL pentru care s-a determinat profilul de rezistență au fost sensibile la acțiunea imipenemului.

7. Pentru cele 81 de izolate de origine animală, în urma investigațiilor moleculare au fost identificate gene ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (70,59%), CTX-M-9 (26,5%), TEM (27,16%), SHV (16,04%), OXA (1,23%) și CIT-M (1,23%).

8. Prevalența de 19,31% pentru câinii din padocuri purtătorii de gene *bla*_{CTX-M} este crescută dacă analizăm importanța portajului fecal cu tulpini rezistente pentru sănătatea publică. Contactul direct cu omul favorizează transmiterea acestor tulpini. Mai mult decât atât, tulpinile producătoare de enzime beta-lactamaze cu spectru extins sunt de cele mai multe ori asociate și cu rezistența la alte clase de antibiotice: fluorochinolone, aminoglicozide și trimetoprim+sulfametoxazol.

9. Pentru cele 36 tulpini bacteriene de origine umană izolate în urma screening-ului ESBL investigațiile moleculare au pus în evidență prezența genelor ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (64,28%), CTX-M-9 (28,57%), TEM (41,67%), SHV (13,89%) și OXA (8,33%). Pentru izolatele de origine umană nu au fost identificate gene ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze.

10. Pentru izolatele de la animale, rezultatele secvențierii au indicat ca fiind dominante genele ce codifică enzimele CTX-M-14 (7/9; 77,77%), CTX-M-15 (5/10; 50%) și CTX-M-1 (5/10; 50%).

11. În urma secvențierii izolatelor de origine umană au fost dominante genele ce codifică enzimele din grupul CTX-M-14 (4/4; 100%) și CTX-M-15 (3/5; 60%).

12. Pentru toate izolatele de origine animală obținute în urma screening-ului ESBL a fost determinat procentul de gene plasmidice de tip *qnr* și *aac*-(6')-Ib-cr ce determină rezistența la quinolone. Grupul de gene dominant a fost *qnrS* (13,58%), urmat apoi de *qnrB* și *aac*-(6')-Ib-cr în proporție de 3,7% și *qnrA* (1,23%).

13. Pentru cele 36 de izolate de origine umană, investigațiile pentru identificarea genelor de tip *qnr* și *aac*-(6')-Ib-cr au arătat o prevalență crescută pentru gena *qnrS* (13,89%), urmată de *aac*-(6')-Ib-cr (5,56%) și *qnrB* (2,78%). Gena *qnrA* nu a fost identificată la izolatele de origine umană.

14. La izolatele de origine umană gena *aac*-(6')-Ib-cr a fost asociată cu prezența genelor CTX-M-1, OXA și TEM.

15. Screening-ul molecular realizat pentru detecția genelor caracteristice rezistenței la colistin (*bla_{mcr-1}* și *bla_{mcr-2}*) a fost negativ atât pentru izolatele de origine animală cât și umană.

16. Din cei 18 repliconi investigați, 12 au fost identificați la tulpinile analizate, dintre care K/B, P1, FIA, FIB, Y, I1, F, N, Hi2, L/M au fost identificați atât la tulpinile bacteriene de origine umană cât și animală.

17. La izolatele de origine animală în plus au fost identificați repliconii A/C și FIIA, iar la izolatele umane repliconul W.

18. În urma investigațiilor PBRT cu scopul de a caracteriza profilul plasmidial al tulpinilor analizate, repliconii IncF, IncI1, IncFIB și IncHi2 au avut frecvența cea mai mare atât la tulpinile de origine umană cât și la cele de origine animală.

19. Plasmidele IncI1, IncFIB și IncHi2 indentificate cel mai frecvent la izolatele de origine animală sunt citate și de literatura de specialitate ca fiind cel mai des implicate în transmiterea markerilor de rezistență la animalele de companie.

20. În investigațiile noastre, repliconul IncN a fost identificat la tulpini de *Escherichia coli* izolate de la animalele de companie, în literatura de specialitate prezența acestui replicon fiind raportată la animalele de companie doar la speciile de *Klebsiella pneumoniae*.

21. Pentru realizarea experimentului de conjugare au fost selectate 16 tulpini CTX-M pozitive și sensibile la acidul nalidixic (12 de origine animală și 4 de origine umană). În urma conjugării au fost obținuți 15 transconjugăți, toți fiind testați prin PCR pentru identificarea genelor de tip *bla_{CTX-M}*. Pentru toți

transconjugării a fost pusă în evidență gena ce codifică enzimele CTX-M, iar repliconii implicați în procesul de transfer de gene au fost Hi2 și I1.

22. Grupul filogenetic predominant pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la animale a fost B1 (35,71%).

23. Pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la proprietari sau personalul sanitar veterinar, grupul filogenetic predominant a fost B2 (35,30%). Portajul fecal cu tulpini din acest grup constituie o problemă de sănătate publică, aceste izolate având un caracter de patogenitate ridicat ce rezultă mai ales din asocierea mai multor caractere de virulență.

24. Majoritatea tulpinilor de *E.coli* CTX-M pozitive au aparținut grupului filogenetic A.

25. Au fost izolate 3 tulpini de *E.coli* ST131-O25: o tulpină de origine animală, caracterizată molecular prin prezența genei *bla*_{TEM} și două tulpini de origine umană al căror substrat molecular a fost reprezentat de genele *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6')-Ib-cr} și respectiv *bla*_{CTX-M-9}.

26. Investigațiile RAPD au pus în evidență o mare diversitate genetică între tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană și tulpinile de origine animală și cele de origine umană.

27. Au fost identificate tulpini de origine animală izolate de la câinii din padocuri sau de la cabinete, caracterizate prin substrat fenotipic și molecular identic sau asemănător ceea ce indică o relație clonală între aceste tulpini și de asemenea că mediul comun al animalelor de la care au fost izolate joacă un rol important în transmiterea acestor tulpini.

28. Au fost identificate tulpini de *E.coli* izolate de la câine și proprietari, caracterizate prin profiluri fenotipice și genotipice identice (gene ESBL, grup filogenetic identic, același profil RAPD), ceea ce demonstrează că animalele de companie pot constitui un rezervor de bacterii producătoare de ESBL pentru om, genele de rezistență fiind transmise cu ușurință între animale și proprietari prin contactul direct sau indirect.

Limitele studiului și perspective de cercetare

Tema tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) la animalele de companie, abordată de noi în prezentul studiu este printre puținele realizate în România.

Portajul fecal cu tulpini de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins la animalele de companie este important prin prisma impactului pe care îl poate avea asupra sănătății publice. Contactul direct dintre animalele de companie și proprietar, prezența genelor de rezistență ce codifică enzimele ESBL pe elemente genetice mobile cum sunt plasmidele, lipsa unor reglementări privind consumul de antibiotice în medicina veterinară și lipsa unui management în tratamentul infecțiilor cu tulpini MDR la animale sunt factori care influențează

transmiterea și circuitul acestor tulpini producătoare de ESBL în natură, pe termen lung implicațiile fiind nu doar de natură economică ci mai ales asupra tratamentului antiinfecțios în medicina umană.

Deși tema aleasă este una de actualitate și prezentul studiu oferă informații despre cât de comun este portajul enterobacteriilor ESBL la animalele de companie, cercetarea noastră are o serie de limitări:

- zona geografică abordată este una restrânsă, probele fiind recoltate din 3 județe din sud-estul Moldovei. O cercetare mai amplă, care să abordeze și celelalte areale din România este necesară pentru a avea o imagine de ansamblu cât mai clară asupra portajului fecal cu tulpini producătoare de ESBL la animalele de companie.

- Comunitatea științifică internațională a abordat tema tulpinilor producătoare de enzime beta-lactamaze cu spectru extins din mai multe puncte de vedere și analizând segmente diferite de la contaminarea apelor cu tulpini producătoare de ESBL până la izolarea acestora de la animale de rentă sau din produsele alimentare de origine animală. În România studii privind prevalența tulpinilor producătoare de ESBL au fost realizate doar la puii crescuți în sistem intensiv. Din aceste considerente alte studii realizate pe alte segmente de animale sunt necesare și în România.

- Numărul de probe analizate de noi a fost relativ mic, în principal datorită unei slabe receptivități a proprietarilor (dar uneori și a medicilor veterinari) în ceea ce privește angajarea în experimente științifice. Pentru obținerea unei imagini cât mai clare a portajului fecal cu tulpini producătoare de ESBL la animalele de companie este necesară nu doar abordarea unei zone geografice mai mari ci și a unui număr mai mare de probe.

- Investigațiile moleculare realizate de noi s-au axat pe identificarea principalelor gene ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, însă cercetări mai aprofundate sunt necesare pentru a identifica și alte tipuri de beta-lactamaze cu spectru extins sau de a căuta markeri de rezistență la alte clase de antibiotice. De asemenea pentru a stabili cu o acuratețe mai mare gradul de omologie genetică între tulpinile izolate de la animale și cele izolate de la om sunt necesare teste de biologie moleculară cu un grad de specificitate și sensibilitate ridicat.

CHAPTER VII. FINAL CONCLUSIONS, STUDY LIMITS AND RESEARCH PERSPECTIVES

1. Following the ESBL screening, of the 279 tested fecal matter samples, 117 (41,93%) strains of *enterobacteriaceae* were obtained, most of them belonging to the *Escherichia coli* species (88.89%), followed by *Klebsiella pneumoniae* (5.98%) and *Proteus spp.* (5.13%).

2. The isolated bacterial strains following the ESBL screening were phenotypically confirmed through the combination disc test by a ratio of 53.84% (63/117 strains).

3. The testing of sensitivity in other classes of antibiotics of the phenotypically confirmed strains as being ESBL was carried out through the diffusimetric method, and sensitivity was determined in 9 antibiotics from 7 different classes: beta-lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, carbapenems, amphenicols.

4. The investigations regarding resistance to other classes of antibiotics of the phenotypically confirmed isolated strains as being ESBL have revealed a high multiple resistance degree to antibiotics (92.85% for the animal strains and 90.47% for the human isolated strains).

5. Unlike the animal strains, human strains presented a high level of sensitivity to the action of amoxicillin/clavulanic acid.

6. All of the 63 presumptive ESBL strains for which the resistance profile was tested/determined were sensitive to the action of imipenem.

7. For the 81 animal isolated strains, following the molecular investigations, genes that codify the enzymes from the groups: CTX-M-1 (70.59%), CTX-M-9 (26.5%), TEM (27,16%), SHV (16,04%), OXA (1,23%) and CIT-M (1.23%) were identified.

8. The prevalence of 19.31% for dogs from shelters carriers of *bla*_{CTX-M} genes is high if we analyze the importance of fecal carriage with resistant strains for the public health. The direct contact with the human favors the transmission of these strains. Moreover, the extended spectrum beta-lactamase enzyme-producing strains are most of the times also associated with resistance to other classes of antibiotics: fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim + sulfamethoxazole.

9. For the 36 human bacterial strains isolated following the ESBL screening, the molecular investigations revealed the presence of genes that codify the enzymes from the groups: CTX-M-1 (64.28%), CTX-M-9 (28.57%), TEM (41.67%), SHV (13.89%) and OXA (8.33%). For the human isolated strains, no genes that codify the AmpC beta-lactamase enzymes were identified.

10. For the animal isolated strains, the results of sequencing indicated that the genes that codify the CTX-M-14 (7/9; 77,77%), CTX-M-15 (5/10; 50%) and CTX-M-1 (5/10; 50%) enzymes were dominant.

11. Following sequencing of human isolated strains, the genes that codify the enzymes from the group CTX-M-14 (4/4; 100%) and CTX-M-15 (3/5; 60%) were dominant.

12. For all the animal isolated strains obtained following the ESBL screening, the percentage of percentage of *qnr* and *aac*-(6')-Ib-cr plasmid coded genes was determined, which determines the resistance to quinolone. The dominant gene group was *qnrS* (13.58%), followed by *qnrB* and *aac*-(6')-Ib-cr by a ratio of 3.7% and *qnrA* (1.23%).

13. For the 36 human isolated strains, the investigations for the isolation of the *qnr* and *aac*-(6')-Ib-cr genes showed a high prevalence for the *qnrS* gene (13.89%), followed by *aac*-(6')-Ib-cr (5.56%) and *qnrB* (2.78%). The *qnrA* gene was not identified in the human isolated strains.

14. In the human isolated strains, the *aac*-(6')-Ib-cr gene was associated with the presence of the CTX-M-1, OXA and TEM genes.

15. The molecular screening carried out for the detection of the genes characteristic to the resistance to colistin (*bla_{mcr-1}* and *bla_{mcr-2}*) was negative both for the animal and the human isolated strains.

16. Of the 18 investigated replicons, 12 were isolated in the analyzed strains, of which K/B, P1, FIA, FIB, Y, I1, F, N, Hi2, L/M were identified both in the human and the animal bacterial strains.

17. In addition, the A/C and FIIA replicons were identified in the animal isolated strains and the W replicon was identified in the human isolated strains.

18. Following the PBRT investigations aiming at characterizing the plasmid profile of the analyzed strains, the IncF, IncI1, IncFIB and IncHi2 replicons had the highest frequency both in the human and the animal strains.

19. The IncI1, IncFIB and IncHi2 plasmids most frequently identified in the animal isolated strains are also quoted by the specialized literature as being the most frequently involved in the transmission of resistance markers in pets.

20. In our investigations, the IncN replicon was identified in strains of *Escherichia coli* isolated from pets; in the specialized literature, the presence of this replicon was reported in pets only in the species of *Klebsiella pneumoniae*.

21. In order to carry out the conjugation experiment, 16 positive CTX-M strains sensitive to nalidixic acid (12 of animal origin and 4 of human origin) were selected. Following the conjugation, 15 transconjugates were obtained, and all of them were tested through PCR for the isolation of *bla_{CTX-M}* genes. The gene that codifies the CTX-M enzymes was highlighted for all transconjugates, and the replicons involved in the gene transfer process were Hi2 and I1.

22. The predominant phylogenetic group for the *E. coli* strains isolated from animals was B1 (35.71%).

23. For the *E. coli* strains isolated from owners or the veterinary sanitary personnel, the predominant phylogenetic group was B2 (35.30%). The fecal carriage with strains from this group represents a public health problem, these isolated strains having a high pathogenicity character which results particularly from the association of several virulence characters.

24. Most CTX-M positive *E. coli* strains belonged to the phylogenetic group A.

25. Three strains of *E. coli* O25 ST131 were isolated: one animal strain, molecularly characterized by the presence of the *bla*_{TEM} gene, and two human strains whose molecular substrate was represented by the *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6)-Ib-cr} and *bla*_{CTX-M-9} genes, respectively.

26. The RAPD investigations revealed a high genetic diversity among the animal strains, human strains and animal strains, and the human strains.

27. Animal strains isolated from dogs from paddocks or practices were identified, characterized by identical or similar phenotypic and molecular substrate, which indicates a clonal relationship between these strains and also that the common environment of the animals from which they were isolated play an important role in the transmission of these strains.

28. Strains of *E. coli* were identified, isolated in pairs from dog and owners, characterized by identical phenotypic and genotypic profiles (ESBL genes, identical phylogenetic group, the same RAPD profile), which proves that pets can represent a reservoir of ESBL bacteria for humans, the resistance genes being easily transmitted between animals and owners through direct contact.

Study limits and research perspectives

The subject of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains in pets, approached by us in this study, is among the few such studies conducted in Romania

The fecal carriage with extended spectrum beta-lactamase-producing *enterobacteriaceae* strains in pets is important due to the impact that it may have on public health. Direct contact between pets and owner, the presence of resistance genes that codify the ESBL enzymes by mobile genetic elements such as plasmids, the lack of some regulations in regard to the consumption of antibiotics in veterinary medicine and the lack of a management in the treatment of infections with MDR strains in animals are factors that influence the transmission and circuit of these ESBL strains in nature, and on the long term the implications are not just economical, but they particularly influence the anti-infective treatment in human medicine.

Although the chosen subject is topical and the present study offers information about how common the ESBL *enterobacteriaceae* carriage is in pets, our research has a series of limitations:

- The approached geographical area is restricted, the samples being collected from 3 counties from the south-east of Moldova. A more ample research, which would approach the other areas of Romania too is required to have a bird's-eye view as clear as possible on the fecal carriage with ESBL strains in pets.

- The international scientific approached subject of extended spectrum beta-lactamase enzyme-producing strains from several points of view and analyzing different segments from contamination of water with ESBL strains to their isolation from revenue animals or from animal food. In Romania, studies regarding the prevalence of ESBL strains were conducted only in chicken grown in intensive system. Due to these reasons, other studies carried out in other animal segments are necessary in Romania too.

- The number of samples analyzed by us was relatively low. In order to obtain an image as clear as possible of the fecal carriage with ESBL strains in pets, it is necessary not only to approach a larger geographic area, but also a larger number of samples.

- The molecular investigations carried out by us focused on the isolation of the main genes that codify the extended spectrum beta-lactamase enzymes, but more thorough researches are necessary to isolate other types of extended spectrum beta-lactamase too or to search resistance markers in other classes of antibiotics. Also, in order to establish the degree the genetic homology between the strains isolated in animals and those isolated in humans at a higher accuracy, molecular biology tests with a high specificity and sensitivity degree are necessary.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Accogli M., Fortini D., Giufrè M., Graziani C., Dolejska M., Carattoli A., Cerquetti M., 2013- *IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in Escherichia coli of animal and human origin*, Clin Microbiol Infect 19: E238–E240.
2. Adamczuk M., Zaleski P., Dziewit L., Wolinowska R., Nieckarz M., Wawrzyniak P., Kieryl P., Plucienniczak A., Bartosik D., 2015- *Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the* , BioMed Research International, vol. 2015, p. 1-12.
3. Agerson Y., Sandvang D., 2005- *Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in Alcaligenes, Arthrobacter and Pseudomonas spp isolated from pigsties and manured soil*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 71(12), 7941-7947.
4. Albrechtova K., Dolejska M., Cizek A., Tausova D., Klimes J., Beborá L., Literakac I., 2012- *Dogs of Nomadic Pastoralists in Northern Kenya are reservoirs of plasmid-Mediated Cephalosporin and Quinolone-resistant Escherichia coli, Including Pandemic Clone B2-O25-ST131*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, vol. 56(7), p. 4013–4017.
5. Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007- *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*, Cell 128, 1037-1050.
6. Ambler RP., 1980- *The structure of beta-lactamases*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, vol 289, 321-331.
7. Anastasi E.M., Matthews B., Gundogdu A., Vollmerhausen T.L., Ramos N.L., Stratton H., Ahmed W., Katouli M., 2010- *Prevalence and Persistence of Escherichia coli Strains with Uropathogenic Virulence Characteristics in Sewage Treatment Plants*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 76 (17), p. 5882–5886.
8. Bajpai T., Pandey M., Varma M., Bhatambare GS., 2014- *Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing uropathogens and their antibiotic resistance profile in patients visiting a tertiary care hospital in central India: implications on empiric therapy*, Indian J. Pathol Microbiol., vol.57, p. 407-412.
9. Baquero F., Canton R., 2008a- *Increasing prevalence of ESBL-producing in Europe.*, Euro. Surveill, vol. 13 (pii), p. 1-11.
10. Barbato L., Melo LC., Abreu J., Oresco C., Neuwirt N., Pestana-de-Castro AF., Lincopan N., 2012- *Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing Gram-negative bacteria from pets, buffalos and psittacines*, 52nd Interscience Conference on antimicrobial agents and chemotherapy (ICAAC), San Francisco – USA, september 9-12.
11. Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S., 1990- *A new plasmidic cefotaximase in a clinical iso- late of Escherichia coli*, Infection, vol. 18, 294–298.
12. Bedenic B., Vranes J., Mihaljevic Lj., Tonkic M., Sviben M., Plecko V., et al., 2007- *Sensitivity and specificity of various beta-lactam antibiotics and phenotypical methods for detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases*, J. Chemother., vol. 19, p. 127-139.

13. Belas A., Salazar A.S., Gama L.T., Couto N., Pomba C., 2014- *Risk factors for faecal colonisation with Escherichia coli producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in dogs*, Veterinary Record, vol. 175, p. 202-208.
14. Bertini A., Poirel L., Mugnier D.P., Villa L., Nordmann P., Caratolli A., 2010- *Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial agents and Chemotherapy, vol. 54(10), p. 4168-4177.
15. Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., Denamur E., 1998- *Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains*, J. Infect. Dis., vol. 177, p. 642–650.
16. Birkett C.I., Ludlam H.A., Woodford N., Brown D.F., Brown N.M., Roberts M.T., et al., 2007- *Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases*, J. Med. Microbiol., vol. 56, p. 52-55.
17. Blanc V., Leflon-Guibout V., Blanco J., Haenni M., Madec J-Y., Raignon G., Bruno P., Mora A., Lopez C., Dahbi G., Dunais B., Anastasy M., Branger C., Moreau R., Pradier C., Nicolas-Chanoine M.H., 2014- *Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing Escherichia coli comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 69(5), p. 1231-1237.
18. Blattner F. R., Plunkett G.I., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., G. Mayew C.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y., 1997- *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*, Science, vol. 277, p. 1453–1461.
19. Bonacorsi S. P. P., Clermont O., Tinsley C., Le Gall I., Beaudoin J., Elion J., Nassif X., Bingen E., 2000- *Identification of regions of the Escherichia coli chromosome specific for neonatal meningitis associated strains*, Infect. Immun., vol. 68, p. 2096–2101.
20. Bortolaia V., Guardabassi L., Trevisani M., Bisgaard M., Venturi L., Bojesen A.M., 2010- *High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolates from Italian broiler flocks*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 54, p. 1623-1626.
21. Briggs C.E., Fratamico P.M., 1999- *Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 43, p. 846–849.
22. Brolund A., 2014- *Overview of ESBL-producing from a Nordic perspective*, Infect Ecol Epidemiol, vol. 4, p. 1-9.
23. Brotzu G., 2000- *Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins*, Clin Microbiol Infect, vol. 6(3), 6-8.
24. Bush K., 1988- *Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future*, Rev Infect Dis, vol. 10, 681-690.
25. Bush K., 1989- *Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b and 2b'*, Antimicrob Agents Chemother, vol. 33, 264-270.
26. Bush K., 2013- *The ABCD's of β -lactamase nomenclature*, J Infect Chemother, vol. 19, 549-559.

27. Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA., 1995- *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*, Antimicrob Agents Chemother, vol. 39, 1211-1233.
28. Cantón R., González-Alba JM., Galán JC., 2012- *CTX-M enzymes origin and diffusion*, Front Microbiol, vol.3, 110-129.
29. Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F. et al., 2008- *Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing in Europe*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 14, p. 144-153.
30. Carattoli A., 2008- *Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 14 (1), p. 117-123.
31. Carattoli A., 2009- *Resistance Plasmid Families in*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 53 (6), 2227-2238.
32. Carattoli A., 2013- *Plasmids and the spread of resistance*, Int J Med Microbiol vol. 303, p. 298–304.
33. Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L., Threlfall E.J., 2005- *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*, Journal of Microbiological Methods, vol. 63(3), p. 219-228.
34. Carattoli A., García-Fernández A., Varesi P., Fortini D., Gerardi S., Penni A., Mancini C., Giordano A., 2008- *Molecular epidemiology of Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy*, J Clin Microbiol vol. 46, p. 103–108.
35. Carattoli A., Lovari S., Franco A., Cordaro G., Di Matteo P., Battisti A., 2005- *Extended-spectrum β -lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 49, p. 833–835.
36. Carlos C., Pires M.M., Stoppe N.C., Hachich E.M., Sato M.I.Z., Gomez T.A.T., Amaral L.A., Ottoboni L.M.M., 2010- *Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination*, BMC Microbiology, vol.10:161, p.1-10.
37. Carvalho A.C., Barbos, A.V., Arais L.R., Ribeiro P.F., Carneiro V.C., Cerqueira A.M.F., 2016- *Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of Escherichia coli from dogs and owners*, Brazilian Journal of Microbiology, vol.47, p:150-158.
38. Chandra V., Goswami PN., 2014- *Detection of TEM and SHV genes in Extended spectrum Beta lactamase (ESBL) producing and Klebsiella pneumoniae isolated from a tertiary care cancer hospital*, National Journal of Medical Research, vol. 4, p. 201-204.
39. Chaudhary M., Payasi A., 2014- *Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β -lactamses producing E.coli, Klebsiella species, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus to CSE1034 and other β -lactams*, Asian. Pac. J. Trop. Med., vol. 7 (1), p. s217-s223.
40. Chen J., Griffiths M.W., 1998- *PCR differentiation of Escherichia coli from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein*, Lett. Appl. Microbiol., vol. 27, p. 369–371.

41. Chiu CH., Su LH., Chu C., Chia JH., Wu TL., Lin TY., Lee YS., Ou JT., 2004- *Isolation of Salmonella enterica serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin*, Lancet, vol. 363, p. 1285-1286.
42. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., 2000- *Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66(10), p. 4555-4558.
43. Clermont O., Dhanji H., Upton M., Gibreel T., Fox A., Boyd D., Mulvey M.R., Nordmann P., Ruppe E., Sarthou J.L., Frank T., Vimont S., Arlet G., Branger C., Woodford N., Denamur E., 2009- *Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy vol. 64, p. 274–277.
44. Clermont O., M.Lavollay, Vimont S., Deschamps C., Forestier C., Branger C., Denamur E., Arlet G., 2008- *The CTX-M-15 producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup*, J. Antimicrob. Chemother., vol.61(5), p.1024-1028.
45. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014- *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth International Supplement M100-S24*, Wayne, PA, USA:CLSI.
46. Colom K., Pérez J., Alonso R., Fernández-Aranguiz A., Lariño E., Cisterna R., 2003- *Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in*, FEMS Microbiol Lett., vol. 223, p. 147-151.
47. Coque T.M., Baquero F., Canton R., *Increasing prevalence of ESBL-producing in Europe*, Euro Surveillance, 2008, 13, 1–11.
48. Cottell JL., Webber MA., Piddock LJ., 2012 -*Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure*, Antimicrob Agents Chemother, vol.56, 4703–4706.
49. Cozma A.P., Carp-Cărare C., Porea D., Mareş M., Guguianu E., Rîmbu C., Carp-Cărare M., 2015- *The prevalence of ESBL-producing strains of and K. pneumoniae, isolated from pets treated with antibiotics-preliminary remarks*, Bulletin USAMV Veterinary Medicine, vol. 72(2), p. 406-410.
50. Cozma A.P., Carp-Cărare M., Ciocan O.A., Carp-Cărare C., Guguianu E., Rîmbu C., Mareş M., 2015- *The prevalence of positive ESBL and Klebsiella pneumoniae strains in the dogs in the Iasi paddock*, Lucrări științifice Medicină veterinară Timișoara., vol. 48(2), p.74-80.
51. D'Andrea MM., Arena F., Pallecchi L., Rossolini GM., 2013- *CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance*, Int J Med Microbiol, vol. 303, 305-317.
52. Dahbi G., Mora A., Lopez C., Alonso MP., Mamani R., Marzoa J., Coira A., Garicia-Garrote F., Pita J-M., Velasco D., Herrera A., Viso S., Blanco JE., Blanco M., Blanco J., 2013- *Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic Escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamases*, Int. J. Antimicrob. Agents., vol. 42, p: 347– 351.
53. Dallenne C., Costa D.A., Decre D., Favier C., Arle G., 2010- *Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in*, J Antimicrob Chemother, vol. 65, p. 490–495.

- 54.Damborg P., Marskar P., Baptiste KE., Guardabassi L.,2012- *Faecal shedding of CTX-M-producing Escherichia coli in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission*, Vet. Microbiol., vol. 154, p. 298-304.
- 55.Damborg P., Nielsen S.S., Guardabassi L.,2009- *Escherichia coli shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections*, Epidemiol Infect., vol.137, p.1457–1464.
- 56.Damborg P., Morsing K.M., Petersen T., Bortolaia V., Guardabassi L., 2015- *CTX-M-1 and CTX-M-15-producing Escherichia coli in dog faeces from public gardens*, Acta Vet. Scand, vol.57(83), p. 1-4.
- 57.Datta N., Kontomichalou P., 1965- *Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in*, Nature, vol.208, 239-241.
- 58.Derbyshire H., Kay G., Evans K., Vaughan C., Kavuri U., Winstanley T., 2009- *A simple disc diffusion method for detecting AmpC and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of* , J. Antimicrob. Chemother., vol. 63, p. 497-501.
59. 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 -lactamaseand AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses*, J Antimicrob Chemother., vol. 67, p: 1368–1374.
- 60.Diestra K., Juan C., Curiao T., Moya B., Miro´ E., Oteo J., Coque T.M., Pérez-Vazquez M., Campos J., Cantón R., Oliver A., Navarro F., 2009- *Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 63, p. 60–66.
- 61.Dolejska M., Villa L., Hasman H., Hansen L., Carattoli A., 2013- *Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli and Salmonella from animals, the environment and humans*, J Antimicrob Chemother vol. 68, p. 333–339.
- 62.Donati V., Feltrin F., Hendriksen RS., Svendsen CA., Cordaro G., García-Fernández A., Lorenzetti S., Lorenzetti R., Battisti A., Franco A., 2014- *Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in Klebsiella spp. from Companion Animals in Italy*, PLoS One, vol.9(3), p.1-7.
63. Dorobăț O.M., Bădicuț I., Tălăpan I., Popoiu M., Țenea C., Borcan A., Botea S., Mihai A., Rafila Al., 2014- *Rezistența enterobacteriilor în anii 2009-2013*, INBI Prof. Dr. Matei Balș.
- 64.Drieux L., Brossier F., Sougakoff W.,Jarlier V., 2008- *Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in : review and bench guide*, Clin Microbiol. Infect., vol.14, p. 90-103.
- 65.Drlica K., Zhao X, 1997-*DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*, Microbiol Mol Biol Rev, vol. 61 p. 377-392.
- 66.Dutta TK., Warjri I., Roychoudhury P., Lalzampaia H., Samanta I., Jordar SN. et. al., 2013- *Extend-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli isolate possessing the Shiga toxin gene (stx1) belonging to the O64 serogroup associated with human disease in India*, J.Clin Microbiol., vol.51, p. 2008-2009.

- 67.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(6), p.515-521.
- 68.Ensor VM., Shahid M., Evans JT., Hawkey PM., 2006- *Occurance, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enetrobacteriaceae from Indian hospital*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 58, p. 1260-1263.
- 69.Ercis S., Sancak B., Kocagöz T., Hasçelik G., Bolmström A., 2007- *Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory*, Scand. J. Infect. Dis., vol. 39, p. 781-785.
- 70.European Centre for Disease Prevention and Control, 2015- *Sinteza ultimelor date privind consumul de antibiotice în UE.*, p.1-11.
- 71.European Medicines Agency, 2016- *Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014*, Trends from 2011 to 2014, EMA/61769/2016.
- 72.Ewers C., Bethe A., Semmler T., Guenther S., Wieler LH., 2012- *Extended-spectrum blactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective*, Clin Microbiol Infect, vol. 18, p: 646-655.
- 73.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 Tierärztliche Wochenschrift, vol.124, p. 94-101.
- 74.Ewers C., Grobbel M., Stamm I., Kopp P.A., Diehl I., Semmler T., Fruth A., Beutlich J., Guerra B., Wieler L.H., Guenther S., 2010- *Emergence of human pandemic O25:H4:ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 65, p. 651-660.
- 75.Falgenhauer L., Schmiede J., Ghosh H., Fritzenwanker M., Yao Y., Bauerfeind R., Imirzalioglu C., Chakraborty T.,2014- *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* vol. 127, p. 445–463
- 76.Fluit A.C., Schmitz F.J., 2004- *Resistance integrons and super-integrons*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 10, p. 272–288.
- 77.Frampton, E. W., Restaino L., 1993- *Methods for Escherichia coli identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidasedetection*, J. Appl. Bacteriol., vol. 74, p. 223–233.
- 78.Francia M.V., Varsaki A., Garcillan-Barcia M.P., Latorre A., Drains C., De la Cruz F.A., 2004- *Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids*, FEMS Microbiol. Rev., vol. 28, p. 79-100.
- 79.Frye JG., Fedorka-Cray PJ.,2003- *Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in Salmonella enteric isolated from animals in the USA from 1999 to 2003*, International Journal of Antimicrobial Agents., vol. 30, p. 134-42.
- 80.Gallah S., Decré D., Genel N., Arlet G., 2014- *The β -Lacta test for direct detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing in urine*, J. Clin. Microbiol., vol. 52, p. 3792-3794.

81. Gandolfi-Decristophoris P., Petrini O., Ruggeri-Bernardi N., Schelling E., 2013- *Extended-spectrum beta-lactamase-producing in healthy companion animals living in nursing homes and in the community*, Am. J. Infect. Control., vol. 41, p. 831-835.
82. Gelband H., Miller-Petrie M., Pant S., Gandra S., Levinson J., Barter D., White A., Laxminarayan R., 2015- *The State of the world's antibiotics 2015*, Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, p:1-84.
83. Giske CG., Sundsfjord AS., Kahlemeter G., Woodford N., Nordmann P., Paterson DL., et al., 2009- *Redefining extended-spectrum beta-lactamses: balancing science and clinical need*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol.63, 1-4.
84. Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C., Bogaerts P., 2007- *Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing*, J. Clin. Microbiol., vol. 45, p. 501-505.
85. Goris J., Konstantinidis T.K., Klappenbach A.J., Coenye T., Vandamme P., and Tiedje M.J., 2007- *DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 57, p. 81–91
86. Guardabassi L., Schwarz S., Loyd D.H., 2004- *Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 54, p. 321-33.
87. Guenther S., Bethe A., Fruth A., Semmler T., Ulrich RG., Wieler LH., Ewers C., 2012- *Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in Escherichia coli isolates from urban rats (Rattus norvegicus) in Berlin, Germany*, PLoS One vol.7, e50331.
88. Guenther S., Grobbel M., Beutlich J., Guerra B., Ulrich RG., Wieler LH., Ewers C., 2010- *Detection of pandemic B2-O25- ST131 Escherichia coli harbouring the CTX-M-9 extended- spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (Rattus norvegicus)*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 65, p. 582-584.
89. Guillard T., Duval V., Moret H., Brasme L., Vernet- Garnier V., De Chapms C., 2010- *Rapid detection of aac (6')-Ib-cr Quinolone Resistance Gene by Pyrosequencing*, J Clin Microbiol, vol. 48(1), p. 286-289.
90. Haenni M., Saras E., Métayer V., Médaille C., Madec J.Y., 2014- *High Prevalence of blaCTX-M-1/Inc11/ST3 and blaCMY-2/Inc11/ST2 Plasmids in Healthy Urban Dogs in France*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 58(9), p. 5358-5362.
91. Händel N., Otte S., Jonker M., Brul S., Ter Kuile B.H., 2015- *Factors that affect transfer of the Inc11 β -Lactam resistance plasmid pESBL-283 between E. coli strains*, Plos one, vol. 10 (4), 1-17.
92. Harada K., Nakai Y., Kataoka Y., 2012- *Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 beta-lactamase in extraintestinal pathogenic Escherichia coli from dogs and cats in Japan*, Microbiology and Immunology, vol. 56, p. 480–485.
93. Harada K., Okada E., Shimizu T., Kataoka Y., Sawada T., Takahashi T., 2012- *Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli isolates: a comparative analysis between dogs and their owners in Japan*, Comp Immunol Microbiol Infect Dis., vol. 35, p.139–144.

94. Hawkey PM., 2008- *Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 14, p. 159-165.
95. Hawser SP., Bouchillon SK., Hoban DJ., Badal RE, Hsueh PR., Paterson DL., 2009- *Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program.*, Antimicrob. Agents. Chemother., vol. 53 , p. 3280-3284.
96. Hayes F., 2003- *Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest*, Science, vol.301, 1496–1499.
97. Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al., 2009- *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*, Clin. Chem., vol. 55, p. 611-622.
98. Henderson D. A., 1999 – *Ciprofloxacin resistance in Campylobacter jejuni isolates: detection of gyrA resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis*, Journal of Clin Microbiology, vol.108, 8- 12;
99. Hernández J., Stedt J., Bonnedahl J., Molin Y., Drobni M., Calisto-Ulloa N., et al., 2012- *Human-associated extended-spectrum β -lactamase in the Antarctic*, Appl Environ Microbiol., vol. 78, p. 2056-2058.
100. 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 Escherichia coli*, J. Bacteriol., vol. 172, p. 6175-6181.
101. Heuer OE., Hammerum AM., Collignon P., Wegener HC., 2006- *Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food*, Clin. Infect. Dis., vol.43, p. 911-916.
102. Ho PL., Chow KH., Yuen Ky., Ng WS., Chau PY., 1998- *Comparison of a novel, inhibitor-potentiased disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 42, p. 49-54.
103. Hopkins K.L., Liebana E., Villa L., Batchelor M., Threlfall E.J., Carattoli A., 2006- *Replicon typing of Plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among Salmonella and Escherichia coli isolates*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 50(9), p. 3203-3206.
104. Hristea A., Olaru D.I., Adams-Sapper S., Riley W.L., 2015- *Characterization of ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from bloodstream infections in three hospitals in Bucharest, Romania- a preliminary study*, Infectious Disease, vol. 47, p. 46-51.
105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>
106. Huang T.D., Bogaerts P., Biren C., Guisset A., Glupczynski Y., 2010- *Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta- lactamase-producing*, J. Clin. Microbiol, vol. 48, p. 2091–2096.
107. Huber H., Zweifel C., Wittenbrink MM., Stephan R., 2013- *ESBL-producing uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs and cats in Switzerland*, Veterinary Microbiology, vol. 162(2-4), p. 992-996.
108. Huovinen P., Huovinen S., Jacoby GA., 1988- *Sequence of PSE-2 beta-lactamase*, Antimicrob Agents Chemother, vol.32, 134-136.

109. Jack GW., Richmond MH., 1970- *A comparative study of eight distinct beta-lactamases synthesized by gram-negative bacteria*, J Gen Microbiol, vol.61, 43-61.
110. Jackson CR., Davis JA., Frye JG., Barrett JB., Hiott LM., 2015- *Diversity of Plasmids and Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolated from Healthy Companion Animals*, Zoonoses Public Health, vol. 62(6), p. 479-488.
111. Jacoby A.G., 2009- *AmpC β -lactamases*, Clinical Microbiology Reviews, vol. 22(1), p. 161-182.
112. Jacoby G., 2005- *Mechanisms of Resistance to quinolones*, Clin. Infect. Dis., vol. 41(2), p. 120-126.
113. 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
114. Jarlier V., Nicolas MH., Fournier G., Philippon A., 1988- *Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in : hospital prevalence and susceptibility patterns*, Rev. Infect. Disc., vol. 10, p. 867-878.
115. Jaurin B. Grundström T., 1981- *AmpC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type*, Proc Natl Acad Sci USA, vol. 78, 4897-4901.
116. Jemima SA., Vergese S., 2008- *Molecular characterization of nosocomial CTX-M type beta-lactamase producing from a tertiary care hospital in south India*, Indian J. Med. Microbiol., vol. 26, p. 365-368.
117. Johns I., Verheyen K., Good L., Rycroft A., 2012- *Antimicrobial resistance in faecal Escherichia coli isolates from horses treated with antimicrobials: A longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses*, Vet Microbiol., vol. 159, p.381–389.
118. Johnson J. R., Stell A.L., 2000- *Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise*, J. Infect. Dis., vol. 181, p. 261–272.
119. 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 Escherichia coli isolates.*, Appl. Environ. Microbiol. vol. 73, 1976–1983.
120. Joint working group of DARC and ARHAI, 2012- *ESBLs- a threat to human and animal health?*, available on-line at https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/215180/dh_132534.pdf
121. Jurcoane S., Cornea P., Stoica I. și Vassu T., 2006- *Tratat de biotehnologie*, vol. II, Editura Tehnica.
122. Kadlec K., Schwarz S., 2008- *Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among Escherichia coli isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 62, p. 469–473.
123. Kang CI., Cha MK., Kim SH., Ko KS., Wi YM., Chung DR. et al., 2013- *Clinical and molecular epidemiology of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli over a 6-year period*, J. Korean Med. Sci., vol. 28, p. 998-1004.

124. 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(3), p. 180-187.
125. Karim, A., L. Poirel, S. Nagarajan, and P. Nordmann. 2001- *Plasmid- mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1*, FEMS Microbiology Letters, vol. 201, 237–241.
126. Karp BE., Engberg J., 2004- *Comment on: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 54, p. 276-278.
127. Kim S., Sung JY., Cho HH., Kwon KC., Koo SH., 2014- *Characterization of CTX-M-14 and CTX-M-15- producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from urine specimens in a tertiary-care hospital*, J. Microbiol. Biotechnol., vol. 24, p. 765-770.
128. Kingsley J., Verghese S., 2008- *Sequence analysis of bla CTX-M-28 an ESBL responsible for third-generation cephalosporin resistance in , for the first time in India*, Indian J. Pathol. Microbiol., vol. 51, p. 218-221.
129. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsunashi S., 1983- *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiellae pneumoiae and Serratia marcescens*, Infection, col.11, 315-317.
130. Lalzampuia H., Dutta TK., Warjiri I., Chandra R., 2013- *PCR-Based Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (blaCTX-M-1 and blaTEM) in Escherichia coli, Salmonella spp. and Klebsiella pneumoniae Isolated from Pigs in North Eastern India (Mizoram)*, Indian J. Microbiol., vol. 53(3), p. 291-296.
131. Lei L., Wang Y., Schwarz S., Walsh R.t., Ou Y., Wu Y., Li M., Shen Z., 2017- *mcr-1 in from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016.*, Emerging Infectious Diseases, vol. 23(4), p. 710-711.
132. 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 Escherichia coli. An exploratory case-control study*, PLoS One, vol. 8(9), e74323.
133. Leverstein-van Hall M.A., HE, M.B., AR, T.D., Paauw A., Fluit A.C., Verhoef J., 2003- *Multidrug resistance among is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin*, J.Infect.Dis., vol.187, p. 251–259.
134. Levy SB., FitzGerald GB., Maccone AB., 1976- *Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man.*, Nature, vol 260, 40–42.
135. Lewis JS., Herrera M., Wickes B., Patterson JE., Jorgensen JH., 2007- *First report of the predominant ESBL isolated in U.S. health care system*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 51, p. 4015-4021.
136. Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D., 2016- *A review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous*, Frontiers in Microbiology, vol. 7., p. 1-27.

137. Licker M., Bădițoiu L., Muntean D., Dragomirescu L., Horhat F., Piluț C., Hogeia E., Deutsch P., Adam A., Moldovan R., 2012- *Surveillance of multi-drug resistant pathogens in two Romanian university hospitals*, Int. J. Infect. Control., vol.8(4), p. 1-8.
138. Liebana E., Batchelor M., Hopkins K.L., Clifton-Hadley F.A., Teale C.J., Foster A., Barker L., Threlfall E.J., and R. H. Davies. 2006- *Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance*, J. Clin. Microbiol., vol. 44, p.1630–1634.
139. Lindsey R. L., Fedorka-Cray P.J., Frye J.G, Meinersmann R.J., 2009- *Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant Salmonella enterica*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 75, 1908–1915.
140. Linscott AJ., Brown WJ., 2005- *Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests*, J. Clin. Microbiol., vol. 43, p. 1081-1085
141. 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*, The Lancet Infectious Diseases, vol. 16, p: 161-168.
142. Livermore D. M.,1995-*Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance*, Clinical Microbiology Reviews, vol. 8, p.557-&.
143. Livermore DM., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini GM., Arlet G., et al., 2007- *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 59, p. 165-174.
144. Livermore DM., Warner M., Mushtaq S., 2007- *Evaluation of the chromogenic Cica-beta-Test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo-beta-lactamases*, J. Antimicrob. Chemother., vol.60, p. 1375-1379.
145. Livermore DM.,2008 – *Defining and extended-spectrum β -betalactamase*, Clinical Microbiology and Infection, vol.14, 3-10.
146. Ljungquist O., Ljungquist D., Myrena M., C. Rydén, M. Finn, Bengtsson B., 2016- *Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC- producing between humans and dogs- pilot study.*, Infection ecology and Epidemiology, vol.6.,e31514
147. Locatelli C., Scaccabarozzi L., Pisoni G., Moroni P.,2010- *CTX-M1 ESBL-producing Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae isolated from cases of bovine mastitis.*, J. Clin. Microbiol., vol. 48, p. 3822-3823.
148. Ma J., Zeng Z., Chen Z., Xu X., Wang X., Deng Y., Lü D., Huang L., Zhang Y., Liu J., Wang M.,2009- *High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac (6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur- resistant isolates from companion and food-producing animals*, Antimicrobials Agents and Chemotherapy, vol. 53, p. 519-24.
149. Măciucă I.E., 2014- *Prevalența tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) izolate din cecumul puilor de carne și implicațiile acestora asupra sănătății publice*, teză de doctorat, Iași.
150. Măciucă I.E., Nicola J.W., Tuchilus C., Dorneanu O., Guguianu E., Carp-Cărare C., Rîmbu C., Timofte D., 2015- *High prevalence of Escherichia coli-producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania*, Microbial Drug Resistance, vol.21(6), p.651-662.

151. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L., 2012- *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, vol. 18(3), p. 268-281.
152. Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., 1998- *Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within population of pathogenic microorganisms*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95, p. 3140-3145.
153. Manafi, M., W. Kneifel, Bascomb S., 1991- *Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics*, Microbiol. Rev., vol. 55, p.335–348.
154. Marcadé G., Deschamps C., Boyd A., Gautier V., Picard B., Branger C., Denamur E., Arlet G., 2009- *Replicon typing of plasmids in Escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamases*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 63, p. 67–71.
155. Mărculescu A., Cernea M., Nueleanu V., Oros N.A., Chereji R., 2007- *Rezistența microbiană față de antibiotice*, Medicamentul veterinar/Veterinary drug, vol.1(1), 44-51.
156. Martínez-Martínez L. et al., 1998- *Quinolone resistance from a transferable plasmid*, Lancet vol.351, p: 797–799
157. Maslow N.J., Brecher M.S., Adams S.K., Durbin A., Loring S., Arbeit D.R., 1993- *Relationship between Indole Production and Differentiation of Klebsiella Species: Indole-Positive and -Negative Isolates of Klebsiella Determined to Be Clonal*, Journal of Clinical Microbiology, vol. 31(8), p. 2000-2003.
158. Matsumoto Y., Ikeda F., Kamimura T., Yokota Y., Mine Y., 1988- *Novel plasmid mediated β -lactamase from Escherichia coli that inactivates oxymino-cephalosporins*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 32(8), 1243-1246.
159. Matsumura Y., Yamamoto M., Nagao M., Hotta G., Matsushima A., Ito Y., Takakura S., Ichiyama S., 2012.- *Emergence and spread of B2-ST131- O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended- spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in Japan*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 67, p: 2612–2620.
160. Matsumura Y., Yamamoto M., Nagao M., Ito Y., Takakura S., Ichiyama S. et al., 2013- *Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups*, Antimicrob. Agents Chemother., vol.57, p. 4736-4742.
161. McDaniels A.E., Rice E.W., Reyes A.L., Johnson C.H., Haugland R.A., Stelma G.N. Jr., 1996- *Confirmational Identification of Escherichia coli, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate Decarboxylase and b-D-Glucuronidase*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 62 (9), p. 3350–3354.
162. Menon T., Bindu D., Kumar C.P., Nalini S., Thirunarayan M.A., 2006- *Comparison of double disc and three dimensional methods to screen for ESBL producers in a tertiary care hospital*, Indian J. Med. Microbiol., vol. 24, p. 117-120.
163. Méric G., Kemsley E.K., Falush D., Saggars E.J., Lucchini S., 2013- *Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in Escherichia coli*, Environmental Microbiology, vol.15(2), p. 487-501.

164. Meyer E., Gastmeier P., Kola A., Schwab F., 2012- *Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli*, Infection, vol.40, p: 685-687.
165. Miftode E., Dorneanu O., Badescu A., Ghibu A., Leca D., Vremera T., Mereuta A., 2012- *Emergence of a new group CTX-M enzyme in Romania and risk factors for extended spectrum beta-lactamase producing infections*, Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi, vol. 116(2), p. 477-480.
166. Mora A., Herrera A., Mamani R., Lopez C., Pilar Alonso M., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., Garcia-Garrote F., Maria Pita J., Coira A., M. Isabel Bernandez, Blanco J., 2010- *Recent Emergence of clonal Group O25b:H4-B2-ST131 *ibeA* Strains among Escherichia coli Poultry Isolates, Including CTX-M-9 Producing strains and Comparison with clinical Human isolates*, Applied and Environmental Microbiology, vol.76(21), p: 6991-6997.
167. Moreno A., Bello H., Guggiana D., Domínguez M., González G., 2008- *Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by Escherichia coli strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin*, Veterinary Microbiology, vol. 129(1-2), p. 203-208.
168. Munday C. J., Whitehead G. M., Todd N. J., Campbell M., Hawkey P.M., 2004- *Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended- spectrum beta-lactamases in York, UK*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 54, p. 628-633.
169. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999- *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th ed.*, NCCLS document M100-S9, Wayne PA:NCCLS.
170. Navarro F., 2006- *Acquisition and horizontal diffusion of β -lactam resistance among clinically relevant microorganisms*, Internatl Microbiol, vol. 9, 79-81.
171. Navarro F., Mesa R.J., Miro E., Gomez L., Mirelis B., Coll P., 2007- *Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in Escherichia coli and its prevalence*, FEMS Microbiol. Lett., vol. 273, p.120–123.
172. Nicolas-Chanoine MH., Blanco J., Leflon-Guibout V., Demarty R., Alonso MP., Caniça MM., Park YJ., Lavigne JP., Pitout J., Johnson Jr., 2008- *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15*, Journal of antimicrobial Chemotherapy, vol.61, 273-281
173. Nóbrega DB., Brocchi M., 2014- *An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences*, J. Infect. Dev. Ctries., vol. 8(8), p. 954-960.
174. O'Keefe A., Hutton TA., Schifferli DM., Rankin SC., 2010- *First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli urinary tract isolates from dogs and cats in the United States*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., vol. 54(8), p. 3489-92.
175. Okubo T., Sato T., Yokota S., Usui M., Tamura Y., 2014- *Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan*, Journal of Infection and Chemotherapy, vol. 20, p. 243–249.
176. Olesen B., Hansen DS., Nilsson F., Frimodt-Moller J., Leihof RF., Struve C., Scheutz F., Johnston B., Krogfelt KA., Johnson JR., 2013- *Prevalence and*

- characteristics of the epidemic multiresistant Escherichia coli ST131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase-producing E. coli isolates in Copenhagen, Denmark*, J. Clin. Microbiol., vol. 51, p: 1779–1785.
177. Olivier M., Mehhl MA., Lust G., 1999- *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequence as markers for canine genetic studies*, J. Hered., vol.90(1), p. 78-82.
 178. Park C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D.Sahm, D.C. Hooper, 2006- *Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*, Antimicrob. Agents Chemother., vol.50(11), p. 3953-3955.
 179. Park CH., Robicsek A., Jacoby GA/, Sahm D., Hooper DC., 2006- *Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin modifying enzyme*, Antimicrob Agents Chemother., vol. 50, p. 3953-3955.
 180. Park H.C., Robicsek A., Jacoby A.G., Sahm D., Hooper C.D., 2006-*Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 50(11), p: 3953–3955.
 181. Patel A., Lakhani S., Khara R., 2014- *Microbiological profile of ventilator associated pneumonia at ICU of rural based teaching hospital*, Int. J. Biol. Med. Res., vol.5, p. 4002-4006.
 182. Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. *Extended-spectrum beta- lactamases: a clinical update*, Clincl. Microbiology. Reviews 18, 657–686.
 183. Patricia A. Bradfor, 2001- *Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*, Clinical Microbiology reviews, vol.14 (4), 933-951.
 184. Peirano G., Asensi MD., Pitondo-Silva A., Pitout JD., 2012- *Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli from Rio de Janeiro, Brazil*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 17, p. 1039-1043.
 185. Peirano G., Sang JH., Pitondo-Silva A., Laupland KB., Pitout JD., 2012- *Molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae over a 10 year period in Calgary, Canada*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 67, p. 1114-1120.
 186. Perilli M., Felcia A., Franceschini N., De Santis A., Pagani L., Luzzaro F. et al., 1997- *Characterization of a new TEM-derived beta-lactamases produced in Serratia marcescens strain*, Antimicrob Agents Chemother, vol.41, 2374-2382.
 187. Petroni A., Corso A., Melano R., Cacace ML., Bru AM., Rossi A. et al., 2002- *Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in Vibrio cholerae O1 E1 Tor isolates in Argentina*, Antimicrob Agents Chemother , vol.46, 1462-1468.
 188. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A., 2002- *Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases.*, Antimicrob. Agents Chemother. vol. 46, p. 1–11.
 189. 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 Escherichia coli extraintestinal infection*, Infect. Immun. vol. 67, p. 546–553.
 190. Pinto L., Radhouani H., Coelho C., Martins da Costa P., Simoes R., Brandao RM., Torres C., Igrejas G., Poeta P.,2010- *Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing Escherichia coli isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 76. p. 4118-4120.

191. Pitout JD., Reisbig MD., Venter EC., Church DL., Hanson ND., 2003- *Modification of the double-disk test for detection of producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases*, J. Clin. Microbiol., vol. 41, p. 3933-3935.
192. Pitout, J.D., Laupland, K.B., 2008- *Extended-spectrum b-lactamase-producing: an emerging public health concern*, The Lancet Infectious Diseases 8 (3), 159–166.
193. Pitton J.S., 1972- *Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics*, Review of Physiology, vol.65, 15-93
194. Platell JL., Cobbold RN., Johnson JR., Heisig A., Heisig P., Clabots C., Kuskowski MA., Trott DJ., 2011- *Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal Escherichia coli isolates from humans and companion animals in Australia*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 55, p: 3782–3787.
195. Platell JL., Johnson JR., Cobbold RN., Trott DJ., 2011- *Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic Escherichia coli of sequence type ST131 in animals and foods*, Veterinary Microbiology, vol. 53(1-2), p. 99–108.
196. Plattel TN., Cohen Stuart JW., de Neeling AJ., Voets GM., Scharringa J., van de Sande N., et al., 2013- *Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting*, Clin Microbiol. Infect., vol. 19, p. 70-76.
197. Poeta P., Radhouani H., Igrejas G., Goncalves A., Carvalho C., Rodrigues J., Vinue L., Somalo S., Torres C., 2008- *Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal Escherichia coli harboring CTX-M and TEM extended- spectrum beta-lactamases*, Appl. Environ. Microbiol., vol.74, p.7439- 7441.
198. Poirel L., Naas T., Nordmann P., 2008- *Genetic support of extended-spectrum β -lactamases*, Clin Microbiol Infect, vol.14, 75-81.
199. Poirel, L., Marque S., Heritier C., Segonds C., Chabanon C., Nordmann P., 2005- *OXA-58, a novel class D β lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 49, 202–208.
200. Pomba C., da Fonseca J.D., Baptista B.C., Correia J.D., Martinez-Martinez L., 2009- *Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent Escherichia coli CTX-M-15 producing Clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 53(1), p: 327-328.
201. Raghunath D., 2008- *Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India*, J Biosci., vol. 33 (4), 593-603.
202. Ravin W.A., 1969- *Evoluția geneticii*, Editura Științifică, București.
203. Rawat V., Singha M., Verma PK., 2013- *Detection of different β -lactamases and their co-existence by using various discs combination methods in clinical isolates of and Pseudomonas spp.*, J. Lab. Physicians, vol.5, p. 21-25.
204. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J.V., 2014- *Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success.*, Trends in Microbiology, vol. 22 (8), p. 438-445.
205. Renvoisé A., Decré D., Amarsy-Guerle R., Huang TD., Jost C., Podglajen I. et al., 2013- *Evaluation of the β -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of* , J. Clin. Microbiol., vol.51, p. 4012-4017.

206. Revathi G., Shannon KP., Stapleton PD., Jain BK., French GL., 1998- *An outbreak of extended-spectrum, β -lactamase-producing Salmonella senftenberg in a burns ward*, J. Hosp. Infect., vol. 40, p. 295-302.
207. Robicsek A., Strahilevitz J., Sahm D.F., Jacoby G.A., Hooper D.C., 2006- *qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant Isolates from the United States, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 50(8), p. 2872-2874.
208. Rocha-Gracia R.C., Cortés-Cortés G., Lozano-Zarain P., Bello F., Martínez-Laguna Y., Torres C., 2015- *Faecal Escherichia coli isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases*, The Veterinary Journal, vol. 203, p. 315–319.
209. Rodriguez-Bano J., Alcalá JC., Cisneros JM., Grill F., Oliver A., Horcajada JP., Tortola T., Mirelis B., Navarro G., Cuenca M., Esteve M., Pena C., Llanos AC., Canton R., Pascual A., 2008a- *Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli*, Arch.Intern.Med., vol. 168(17), p. 1897–1902.
210. Rutland B.E., Weese J.S., Bolin C., Au J., Malani A., 2009- *Human-to-dog transmission of of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Emerging Infectious Diseases., vol.15, p. 1328-1330.
211. Rzewuska M., Czopowicz M., Kizerwetter-Uwida M., Chrobak D., Baszczak B., Binek M., 2015- *Multidrug Resistance in Escherichia coli Strains Isolated from Infections in Dogs and Cats in Poland (2007–2013)*, The Scientific World Journal, vol.2015, p.1-8.
212. Sallem R. B., Ben Slama K., Rojo-Bezares B., Porres-Osante N., Jouni A., Klibi N., Boudabous A., Sáenz Y., Torres C., 2014- *IncI1 plasmids carrying blaCTX-M-1 or blaCMY-2 genes in Escherichia coli from healthy humans and animals in Tunisia*, Microbial Drug Resistance, vol. 20, p. 495–500.
213. Sallem RB., Gharsa H., Slama KB., Rojo-Bezares B., Estepa V., Porres-Osante N., Jouini A., Klibi N., Sáenz Y., Boudabous A., Torres C., 2013- *First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal Escherichia coli isolates from Healthy Pets in Tunisia*, Vector-borne and Zoonotic Diseases, vol.13 (2), p. 98-102. \
214. Sanger F., Coulson AR. 1975- *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*, J. Mol. Biol., vol. 94 (3), p. 441–448.
215. Sanger F., Nicklen S., Coulson AR., 1977- *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 74 (12), p. 5463–5467.
216. Santos L., Moura AR., Aguilar-Ramires P., Castro AP., Lincolpan N., 2013- *Current status of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing in animals*, Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Ed. A. Mendez-Vilas, p.1600-1607.
217. Saway T., Mitsuhashi S., Yamagishi S., 1968- *Drug resistance of enteric bacteria.XIV.Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminopenicillin*, Jpn J Microbiol, vol. 12, 423-434.
218. Schmiedel J., Falgenhauer L., Domann E., Bauerfeind R., Prenger-Berninghoff E., Imirzalioglu C., Chakraborty T., 2014- *Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany*, BMC Microbiology, vol. 14, p. 187-200.
219. Segal H., Thomas R., Gay E.B., 2003- *Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in*

- Acinetobacter baumannii*, Plasmid., vol. 49, p. 169–178.
220. Selander R.K.,Caugant D.A., Whittam T.S., 1987- *Genetic structure and variation in natural populations of Escherichia coli* in Neidhardt F C, Ingraham J L, Low K B, Magasanik B, Schaechter M, Umbarger H E, editors . *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 1625-1648.
 221. Sennati S., Santella G., Di Gonza J., Pallecchi L., Pino M., Ghiglione B., et al., 2012- *Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15*, Antimicrob. Agents. Chemother., vol. 56, p. 6003-6005.
 222. Shaheen BW., Nayak R., Foley SL., Kweon O., Deck J., Park M., Rafii F., Boothe DM,2011- *Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical Escherichia coli isolates from companion animals in the United States*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., vol. 55(12), p. 5666-5675.
 223. 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 Journal of Biological Sciences, 22,90-101.
 224. Shashwati N., Kiran T., Dhanvijay AG., 2014- *Study of extended spectrum β -lactamase producing and antibiotic coresistance in a tertiary care teaching hospital*, J. Nat. Sc. BiolMed., vol.5, p.30-35.
 225. Sherley M., Gordon D.M., Collignon P.J., 2003- *Species differences in plasmid carriage in the*, Plasmid, vol. 49, 79–85.
 226. Shin KS., Son BR., 2002- *Comparison of Vitek ESBL Test and other methods for detecting extended-spectrum-lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella species*, Korean J. Clin. Pathol., vol. 22, p. 21-26.
 227. Sidjabat HE., Hanson ND., Smith-Moland E., Bell JM., Gibson JS., Filippich LJ., Trott DJ.,2007- *Identification of plasmid-mediated extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in Enterobacter spp. isolated from dogs*, Journal of Medical Microbiology, vol. 56 (3), p. 426-34.
 228. Silva N., Costa L., Goncalves A., Sousa M., Radhouani H., Brito F., Igrejas G., Poeta P., 2012- *Genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from retail chicken products including CTX-M-9 containing isolates: a food safety risk factor*, Br. Poult. Sci., vol. 53, p. 747-755.
 229. Silvia Munoz-Price L., 2016.-*Extended-spectrum beta-lactamases*,, available on-line at <http://www.uptodate.com/contents/extended-spectrum-beta-lactamases>
 230. Silvia–Sanchez J., Garza-Ramos JU., Reyna-Flore F., Sánchez-Perez A., Rojas-Moreno T., Andrade-Almaraz V., et al., 2011- *Extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae causing nosocomial infections in Mexico. A retrospective and multicenter study*, Arch. Med. Res., vol. 42, p. 156-162.
 231. Simmen S., Zurfluh K., Nüesch-Inderbinen M., Schmitt S., 2016- *Investigation for the Colistin Resistance Genes mcr-1 and mcr-2 in Clinical Isolates from Cats and Dogs in Switzerland*, ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences, vol.2(4), p. 26-29.
 232. Singh RM., Singh HL., 2014- *Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing* , J. Infect Dev. Ctries., vol. 8, p. 408-415.

233. Solcan C., 2008- *Biologie moleculară generală și aplicată*, Editura Performantica, Iași.
234. Solcan M., Sisea CR., 2012- *Biologie moleculară*, Iași.
235. Song W., Bae IK., Lee YN., Lee CH., Lee SH., Jeong SH., 2007- *Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of Klebsiella spp and Escherichia coli*, J. Clin. Microbiol., vol. 45, p. 1180-1184.
236. Sood S., 2013- *Comparative Evaluation of the in-vitro activity of six β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against Gram Negative bacilli*, J. Clin. Diagn. Res., vol.7, p.224-228.
237. Sorum H., 1994- *Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments*, Appl Environ Microbiol., vol. 60, 4015–4021.
238. Sridhar Rao P.N., 2015- *Extended spectrum beta-lactamases-a comprehensive review*, available on-line at <http://www.microrao.com/>
239. Steen SI., Webb PJ., 2007- *Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from companion animals*, Vet. Rec., vol. 161 (20), p. 703.
240. Stürenburg E., Sobottka I., Noor D., Laufs R., Mack D., 2004- *Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL E-test to detect extended-spectrum beta-lactamases in a strain collection*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 54, p. 134-138.
241. Sturød K., Dahle UR., Berg ES., Steinbakk M., Wester AL., 2014- *Evaluation of the ability of four ESBL-screening media to detect ESBL-producing Salmonella and Shigella*, BMC Microbiol., vol.14, p. 217-226.
242. Su Z., Dai X., Chen J., Kong F., Wang H., Li Y., Peng S., Wang S., Shao Q., Lv L., Xu H., 2008- *The bla(CTX-M-1) gene located in a novel complex class I integron bearing an ISCR1 element in Escherichia coli isolates from Zhenjiang, China*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 62(5), p.1150–1151.
243. Sun Y., Zeng Z., Chen S., Ma J., He L., Liu Y., Deng Y., Lei T., Zhao J., Liu JH., 2010- *High prevalence of blaCTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China*, Clin. Microbiol. Infect., vol. 16, p. 1475–1481.
244. Sunde M., Norstrom M., 2006- *The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolated from Norwegian meat and meat products*, J. Antimicrob. Chemother., vol.58, p. 741-747.
245. Sunde M., Tharaldsen H., Slettemeas JS., Norstrom M., Carattoli A., Bjorland J., 2009- *Escherichia coli of animal origin in Norway contains a blaTEM-20-carrying plasmid closely related to blaTEM-20 and blaTEM-52 plasmids from other European countries Study for monitoring antimicrobial resistance trends*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 63, p. 215- 216.
246. Tamang M.D., Nam H.M., Jang G.C., Kim S.R., Chae M.H., Jung S.C., Byun J.W., Park Y.H., Lim S.K., 2012- *Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli isolated from stray dogs in South Korea*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 56, p. 2705–2712.

247. Tamang MD., Nam HM., Jang GC., Kim SR., Chae MH., Jung SC., Byun JW., Park YH., Lim SK.,2012- *Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase and Plasmid mediated AmpC β -Lactamase-producing Escherichia coli Isolated from Stray Dogs from Korea*, Antimicrobials Agents and Chemotherapy, vol. 56(5), p. 2705-2712.
248. Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E., 2010- *The population genetics of commensal Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol., vol. 8, p. 207–217.
249. Thenmozhi S., Moorthy K., Sureshkumar B.T., Suresh M.,2014- *Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing in clinical field: a review*, Int. J. Pure App. Biosci., vol.2 (3), 207-226.
250. Thomson KS., Sanders CC., 1992- *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family : comparison of the double-disc and three-dimensional tests*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 36, p. 1877-1882.
251. Tibayrenc M., 2007- *Encyclopedia of infectious diseases modern methodologies*, Editura John Wiley and Sons Inc., New Jersey.
252. Timofte D., Dandrieux J., Wattret A., Fick J., Williams NJ.,2011- *Detection of extended-spectrum beta-lactamase positive Escherichia coli in bile isolates from two dogs with bacterial cholangio-hepatitis*, J. Clin. Microbiol., vol. 49, p. 3411-3414.
253. Timofte D., Măciucă I.E., Kemmett K., Wattret A., Williams N.J., 2014- *Detection of the human-pandemic Escherichia coli B2-O25b-ST131 in UK dogs*, Veterinary Record, vol. 174(14), p. 352-353.
254. Tritram SG., Pitout MJ., Forward K., Campbell S., Nichols S., Davidson RJ., 2008- *Characterization of extended-spectrum beta-lactamase producing isolates of Haemophilus parainfluenzae*, Journal Antimicrob Chemother, vol.61, 509-514.
255. Tuchiluş C., Mereuţă A.M., Bădescu A., Buiuc D., 2011- *Prevalenţa crescută de beta-lactamaze de tip CTX-M cu spectru extins la tulpinile de izolate în Nord-Vestul României*, Revista Română de Medicină de Laborator, vol. 19(3), p. 251-257.
256. Urwin R., Maiden M.C.J., 2003- *Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology*, Trends Microbiol.,vol. 11, p. 479-487.
257. Vahaboglu H., Coskuncan F., Tansel O., Ozturk R., Sahin N., Koksai I., et al., 2001- *Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing Acinetobacter spp and Pseudomonas aeruginosa strains*, Journal of Medical Microbiology, vol.50, 642-645.
258. Vaidya K. V., 2011- *Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum β lactamase-producing*, Journal of Laboratory Physicians, vol.3 (1), 37-42.
259. Van Loo I., Huijsdens X., Tiemersma E., de Neeling A, Van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J., 2007- *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans*, Emerg. Infect. Dis., vol.13, p. 1834-1839.
260. Veldman K., van Tulden P., Kant A., Testerink J., Mevius D., 2013- *Characteristics of cefotaxime-resistant Escherichia coli from wild birds in The Netherlands*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 79, p. 7556–7561.
261. Vetting MW., Park CH., Hegde SS., Jacoby GA., Hooper DC., Blanchard JS.2008- *Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib*

- and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant, *Biochemistry*, vol.47, p. 9825-9835.
262. Villa L., García-Fernández A., Fortini D., Carrattoli A., 2010- *Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol.65, p. 2518-2529.
 263. Walsh TR., Toleman MA., Jones RN., 2007- *Comment on: Occurance, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in from Indian hospitals*, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol 59, p. 799-800.
 264. Walther-Rasmussen J., Høiby N., 2002- *Plasmid-borne AmpC β -lactamases*, *Can. J. Microbiol.* vol. 48, p. 479–493.
 265. Wang G., Huang T., Surendraiah PK., Wang K., Komal R., Zhuge J., et al., 2013- *CTX-M β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in suburban New York City, New York, USA*, *Emerg. Infect. Dis.*, vol.19, p. 1803-1810.
 266. Wannaprasat W., Padungtod P., Chuanchuen R.,2011- *Class 1 integrons and virulence genes in Salmonella enterica isolates from pork and humans*, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, vol.37, p. 457-461.
 267. Watson E., Jeckel S., Snow L., Stubbs R., Teale C., Wearing H., Horton R., Toszeghy M., Tearne O., Ellis-Iversen J., Coldham N.,2011- *Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase E. coli (CTX-M-15) on a commercial dairy farm*, *Vet. Microbiol.*, vol. 154, p. 339-346.
 268. 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 (13), p. 354.
 269. Wedley AL., Maddox TW., Westgarth C., Coyne KP., Pinchbeck GL., Williams NJ., Dawson S.,2011- *Prevalence of antimicrobial-resistant Escherichia coli in dogs in a cross- sectional, community-based study*, *Vet. Rec.*, vol. 168, p. 354-360.
 270. Wiegand I., Geiss HK., Mack D., Sörenburg E., Seifert H., 2007- *Detection of extended-spectrum beta-lactamases among by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures*, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, p. 1167-1174.
 271. Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B., Lübke-Becker A.,2011- *Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples*, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, p. 635– 641
 272. Willems E., Verhaegen J., Magerman K., Nys S., Cartuyvels R., 2013- *Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli*, *Int. J. Antimicrob Agents*, vol. 41, p. 99-109.
 273. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak.K.J., Rafalski J.A.,Tingey S.V., 1990- *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, *Nucleic Acid Research*, vol.18 (22), p. 6531-6535.
 274. Wittum TE., Mollenkopf DF., Daniels JB., Parkinson AE., Mathews JL., Fry PR., Abley MJ., Gebreyes WA.,2010- *CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases present in Escherichia coli from the feces of cattle in Ohio, United States*, *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 7, p. 1575-1579.

275. Wong MH., Zeng L., Liu JH., Chen S.,2013- *Characterization of Salmonella food isolates with concurrent resistance to ceftriaxone and ciprofloxacin*, Foodborne Pathog. Dis., vol. 10, p. 42- 46.
276. Woodford N., Fagan Ej., Ellington MJ., 2006- *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases*, J. Antimicrob Chemother., vol. 57, p. 154-155.
277. www.mateibals.ro
278. www.oxoid.com
279. www.redox.com.ro
280. www.totallab.com
281. www.yourgenom.org
282. Xavier B.B., Lammens C., Ruhai R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S., 2016- *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium*, Euro Surveill., vol. 21(27), pii=30280.
283. Xia S., Fan X., Huang Z., Xia L., Xiao M., Chen R. et al., 2014- *Dominance of CTX-M type extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China*, Plos One, vol.9, e100707.
284. Xiong, X. et al., 2011- *Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram- negative bacterium*, Nucleic Acids Res., vol. 39, p. 3917–3927.
285. Yano H., Uemura M., Endo S., Kanamori H., Inomata S., Kakuta R. et al., 2013- *Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates from Escherichia coli at a Japanese tertiary hospital*, Plos one, vol.8, e64359.
286. Zhao W. D., Yan P., Guan HN., Zhang QZ., 2014- *Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase in clinical clones of Escherichia coli in Southwest China*, J Basic Microbiol., vol. 54, p. 247-252.
287. Zou LK., Wang HN., Zeng B., Zhang AY., Li JN., Li XT., Tian GB., Wei K., Zhou YS., Xu CW., Yang ZR.,2011- *Phenotypic and genotypic characterization of beta-lactam resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from swine*, Vet. Microbiol., vol.149, p.139-146.

ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI

ANNEX 1. ABBREVIATION LIST

ADN- acid dezoxiribonucleic
AMC- amoxicilină/acid clavulanic
AMP-ampicilină
AmpC- cefalosporinaze clasa Ambler C
ATM-aztreonam
Bla- genă ce codifică sinteza de beta-lactamaze
Bp – perechi de bază
C -cloramfenicol
ChuA- gene required for heme transport
CLSI- Clinical Laboratory Standards Institute
Cn – gentamicină
CTX- cefotaxim
CTC- cefotaxim/acid clavulanic
CAZ- ceftazidim
CZC- ceftazidim/acid clavulanic
CMI- concentrație minimă inhibitorie
CPD-cefpodoxim
CPC- cefpodoxim/ acid clavulanic
CTX-M-Munich-cefotaximază
EARSS-NET- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ENR- enrofloxacin
EFSA- European Food Safety Authority
ESBL- enzime beta-lactamaze cu spectru extins
FOX-cefoxitin
IPM-imipenem
MLST- multilocus sequence typing
MYSTIC- Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
NA- acid nalidixic
Nr.- număr
OXA- oxacilinază
PBRT- PCR Based Replicon Typing
PCR-Polimerase Chain Reaction
PFGE-Pulse field Gel Electrophoresis
RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA
SENTRY- Antimicrobial Surveillance Program
SHV- beta-lactamază numită sulfhydryl variable

SMART- Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends

ST- sequence type

SXT- sulfamethoxazole/trimethoprim

TE- tetraciclină

TEM- betalactamază numită după pacientul Temoniera

TspE4C2-Anonymoud DNA fragment

uidA-beta-glucuronidase encoding gene

UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

uspA- universal stress protein gene

Yja- genă încă necunoscută determinată după secvențierea completă a genomului tulpinii *E.coli* K12

µg- microgram

ANEXA 2. LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1.Clasificarea funcțională a beta-lactamazelor realizată de Bush, Jacoby și Medeiros.....	31
Tabelul 1.2. Genotipuri ESBL izolate atât de la om cât și de la animale la nivel mondial.....	42
Tabelul 2.1.Valorile recomandate de CLSI pentru interpretarea screening-ului ESBL.....	50
Tabelul 4.1.Proveniența și numărul de probe de fecale analizate în acest studiu.....	66
Tabel 4.2. Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru încadrarea taxonomică a tulpinilor izolate.....	68
Tabelul 4.3.Condițiile de amplificare prin tehnica PCR pentru identificarea speciei <i>E.coli</i>	69
Tabelul 4.4. Antibioticele utilizate pentru testarea sensibilității la alte clase antimicrobiene.....	71
Tabelul 4.5.Fenotipurile de rezistență identificate la tulpinile bacteriene de origine animal.....	76
Tabelul 4.6.Fenotipurile de rezistență identificate la tulpinile bacteriene de origine umană.....	77
Tabelul 5.1.Condițiile de amplificarea prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins.....	82
Tabel 5.2.Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele ESBL.....	83
Tabelul 5.3.Condițiile de amplificarea prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze.....	84
Tabel 5.4.Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele AmpC β -lactamaze.....	85
Tabelul 5.5. Condițiile de amplificare prin PCR pentru identificarea genelor ce codifică enzimele qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, MCR-1, MCR-2.....	87

Tabelul 5.6. Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru detecția principalelor gene codante ce codifică enzimele qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, MCR-1, MCR-2.....	88
Tabelul 5.7. Condițiile de amplificare prin PCR pentru identificarea principalelor plasmide implicate în transmiterea markerilor de rezistență la antibiotic.....	89
Tabelul 5.8. Secvențele primerilor și temperaturile de aliniere utilizate în reacția PCR pentru detecția principalelor plasmide implicate în transmiterea rezistenței la antibiotice.....	90
Tabelul 5.9. Rezultatele secvențierii genelor de tip CTX-M, TEM, SHV izolate de la tulpinile de origine animal.....	96
Tabelul 5.10 Rezultatele secvențierii genelor de tip CTX-M, TEM, OXA izolate de la tulpinile de origine umană.....	99
Tabelul 5.11. Rezultatele PBRT pentru tulpinile analizate.....	109
Tabelul 5.12. Profilul plasmidic și genele de rezistență identificate pentru tulpinile analizate.....	113
Tabel 5.13. Rezultatele experimentului de conjugare pentru izolatele de E. coli CTX-M pozitive, sensibile la acid nalidixic.....	116
Tabelul 6.1. Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR multiplex pentru încadrarea în grupul filogenetic a tulpinilor de <i>E.coli</i>	119
Tabelul 6.2. Condițiile de amplificare PCR pentru identificarea genelor pe baza cărora se realizează încadrarea tulpinilor de <i>E.coli</i> în filogrupuri.....	119
Tabelul 6.3. Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la PCR pentru încadrarea în serogruupul O25 și grupul clonal ST131.....	121
Tabelul 6.4. Condițiile de amplificare PCR pentru identificarea serogrupului O25 și a grupului clonal ST131 pentru tulpinile de <i>E.coli</i> filogrupul B2.....	122
Tabelul 6.5. Designul primerilor și temperaturile de aliniere utilizate la RAPD pentru analiza diversității genetice a tulpinilor de ESBL.....	122
Tabelul 6.6. Condițiile de amplificare RAPD pentru analiza diversității genetice a tulpinilor de <i>E. coli</i> ESBL.....	123

ANNEX 2. LIST OF TABLES

Table.1.1 Functional classification of beta-lactamases by Bush, Jacoby and Medeiros.....	31
Table 1.2. ESBL genotypes isolated from both humans and animals worldwide.....	42
Table 2.1. Recommended CLSI values for ESBL screening.....	50
Table 4.1. The origin and number of faeces analyzed in this study	66
Table 4.2. Primer design and alignment temperatures used in PCR for taxonomic classification of isolated strains.....	68
Table 4.3. PCR amplification conditions for identification of <i>E.coli</i>	69
Table 4.4. Antibiotics used to test susceptibility to other antimicrobial classes.....	71
Table 4.5. Resistance phenotypes identified in bacterial strains isolated from animals.....	76
Table 4.6 Resistance phenotypes identified in bacterial strains isolated from humans.....	77
Table 5.1. PCR amplification conditions for identification of genes encoding extended-spectrum beta-lactamase enzymes.....	82
Table 5.2. Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding ESBL enzymes.....	83
Table 5.3. PCR amplification conditions for identification of genes encoding AmpC beta-lactamase enzymes.....	84
Table 5.4. Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding AmpC β -lactamase enzymes.....	85
Table 5.5. PCR amplification conditions to identify genes encoding the enzymes qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, MCR-1, MCR-2.....	87
Table 5.6. Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main genes encoding the enzymes qnrA, qnrB, qnrS, aac-(6')-Ib-cr, MCR-1, MCR-2.....	88

Table 5.7. PCR amplification conditions to identify the main plasmids involved in the transmission of antibiotic resistance markers.....	89
Table 5.8. Primer design and alignment temperatures used for PCR to detect the main plasmids involved in the transmission of antibiotic resistance.....	90
Table 5.9.CTX-M, TEM, SHV gene sequencing results isolated from animal strains.....	96
Table 5.10 CTX-M, TEM, OXA gene sequencing results isolated from human strains.....	99
Table 5.11. PBRT results for the strains analyzed.....	109
Table 5.12.Plasmid profile and resistance genes identified for the analyzed strains.....	113
Table 5.13. Conjugation Experiment results for E. coli producing CTX-M and susceptible to nalidixic acid.....	116
Table 6.1. Primer design and alignment temperatures used in multiplex PCR for assigning E. coli strains to the phylogenetic group.....	119
Table 6.2. PCR amplification conditions for identifying genes based on which E. coli strains are assigned to phylogruples.....	119
Table 6.3. Primer design and alignment temperatures used for O25-ST131 clonal group PCR.....	121
Table 6.4. PCR amplification conditions for the O25-ST131 clonal group identification for E. coli strain B2.....	122
Table 6.5. Primer design and alignment temperatures used in RAPD to analyze the genetic diversity of E. coli ESBL strains.....	122
Table 6.6. RAPD amplification conditions for the analysis of the genetic diversity of E. coli ESBL strains.....	123

ANEXA 3. LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Repere importante în apariția și evoluția enzimelor beta-lactamaze ce determină rezistența la antibiotice.....	28
Fig. 1.2. Distribuția globală a diferitelor genotipuri ESBL de origine umană	40
Fig. 4.1. Colonii de <i>E.coli</i> pe mediul Brilliance ESBL Oxoid (foto original)..	67
Fig. 4.2. Metoda discurilor combinate (foto original).....	70
Fig. 4.3. Antibiotogramă realizată în vederea încadrării tulpinilor ESBL în categoria MDR.....	71
Fig. 4.4. Procentajul enterobacteriilor prezumtiv ESBL din totalul de probe analizate.....	72
Fig. 4.5. Procentajul enterobacteriilor prezumtiv ESBL raportat la proveniența probelor analizate.....	73
Fig. 4.6. Spectrul enterobacteriilor obținute în urma screening-ului ESBL...	74
Fig. 4.7. Procentul tulpinilor bacteriene confirmate fenotipic ESBL.....	75
Fig. 4.8.Rezistența izolatelor de origine animală la alte clase de antibiotice.....	79
Fig. 4.9. Procentul de rezistență al tulpinilor de origine umană la alte clase de antibiotice.....	79
Fig. 5.1. Principalele gene identificate la bacteriile producătoare de ESBL de la animalele de companie.....	93
Fig. 5.2. Spectrul tulpinilor bacteriene CTX-M-U pozitive.....	94
Fig. 5.3.Prevalența purtătorilor de tulpini <i>E.coli</i> CTX-M pozitive din padocuri	95
Fig. 5.4.Spectrul principalelor gene identificate la bacteriile producătoare de ESBL de la proprietari/personal sanitar veterinar.....	97
Fig. 5.5.Spectrul genotipurilor ESBL de tip CTX-M identificate de la tulpinile bacteriene de origine umană.....	97
Fig. 5.6. Prevalența tulpinilor bacteriene de origine animală AmpC pozitive.....	100

Fig. 5.7. Prevalența tulpinilor de origine animală pozitive pentru markerii de rezistență la fluorochinolone.....	101
Fig. 5.8. Prevalența tulpinilor de origine umană pozitive pentru rezistența la fluorochinolone	102
Fig. 5.9. Cele 3 PBRT realizate pentru tulpinile analizate (a;b;c).....	107
Fig. 5.10. Tipuri de repliconi identificați la tulpinile bacteriene de origine animală și umană analizate.....	108
Fig. 6.1. Schema pentru încadrarea în grupurile filogenetice a tulpinilor de <i>E. coli</i>	120
Fig. 6.2. Încadrarea tulpinilor de <i>E.coli</i> în filogrupuri.....	123
Fig. 6.3. Grupurile filogenetice identificate la izolatele de <i>E.coli</i> de origine animală.....	124
Fig. 6.4. Grupurile filogenetice identificate la izolatele de <i>E.coli</i> de origine umană.....	125
Fig. 6.5. Spectrul grupurilor filogenetice identificate la tulpinile de <i>E.coli</i> CTX-M pozitive.....	126
Fig. 6.6. Rezultatele pentru izolarea grupului clonal ST131.....	127
Fig. 6.7. Rezultatele pentru izolarea serogrupului O25.....	128
Fig. 6.8. RAPD tulpini de <i>E.coli</i>	130
Fig. 6.9. Dendograma rezultată în urma interpretării RAPD realizat pentru tulpinile de <i>E.coli</i> de origine umană și animală izolate în urma screening-ului ESBL și care prezintă profiluri similare de rezistență. Dendograma a fost construită folosind coeficientul de similaritate DICE (0,5) și metodele de grupare UPGMA. Gradul de similaritate este afișat pe bara de scală.....	131

ANNEX 3. LIST OF FIGURES

Fig. 1.1. Significant milestones in the emergence and evolution of beta-lactamase enzymes that determine resistance to antibiotics Landmarks.....	28
Fig. 1.2. The global distribution of different ESBL genotypes of human origin.....	40
Fig. 4.1. <i>E. coli</i> on Brilliance ESBL Oxoid medium (original photo).....	67
Fig. 4.2. Combined Disc Method (Original Photo).....	70
Fig. 4.3. Susceptibility test for ESBL strains to be categorized as MDR (original photo).....	71
Fig. 4.4. Percentage of ESBL presumptive from the total of analyzed samples.....	72
Fig. 4.5. Percentage of ESBL presumptive versus provenance of analyzed samples.....	73
Fig. 4.6. Spectrum of enterobacteria obtained from ESBL screening.....	74
Fig. 4.7. Percentage of bacterial strains confirmed phenotypically ESBL.....	75
Fig. 4.8. Resistance of strains isolated from animal to other classes of antibiotics.....	79
Fig. 4.9. Resistance of strains isolated from human to other classes of antibiotics.....	79
Fig. 5.1. The main genes identified in ESBL producing bacteria	93
Fig. 5.2. Spectrum of CTX-M-U positive bacterial strains.....	94
Fig.5.3. Prevalence of carriers of <i>E.coli</i> producing CTX-M isolated from dogs feces from dog shelters.....	95
Fig. 5.4. Spectrum of the main isolated genes from owners / sanitary veterinary staff.....	97
Fig. 5.5. Spectrum of CTX-M type ESBL isolated from human bacterial strains.....	97
Fig. 5.6. Prevalence of animal bacterial strains producing AmpC beta-lactamases.....	100

Fig. 5.7. Prevalence of animal strains positive for markers of resistance to fluoroquinolones.....	101
Fig. 5.8. Prevalence of human strains positive for fluoroquinolone resistance.....	102
Fig. 5.9. The 3 PBRTs for the analyzed strains (a; b; c).....	107
Fig. 5.10. Types of replicons identified in analyzed animal and human bacterial strains.....	108
Fig. 6.1. Scheme for assigning <i>E. Coli</i> strains to phylogenetic groups.....	120
Fig. 6.2. Assigning <i>E. coli</i> strains to phylogenetic groups.....	123
Fig.6.3. The phylogenetic groups identified in <i>E. coli</i> isolated from animals..	124
Fig.6.4. The phylogenetic groups identified in <i>E. coli</i> isolated from humans..	125
Fig. 6.5. Spectrum of phylogenetic groups identified in <i>E.coli</i> producing CTX-M.....	126
Fig. 6.6. Results for ST131 clonal group isolation.....	127
Fig. 6.7. Results for O25 serogroup isolation.....	128
Fig. 6.8. RAPD strains of <i>E. coli</i>	130
Fig. 6.9. RAPD Dendogram showing the degree of genetic diversity for <i>E. coli</i> strains of human and animal origin isolated from ESBL screening. The dendogram was constructed using the DICE similarity coefficient (0,5) and UPGMA grouping methods. The degree of similarity is displayed on the scale bar.....	131

ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ANNEX 4. SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED

În calitate de prim autor:

1. Andreea-Paula COZMA, Cătălin CARP-CĂRARE, Oana Alexandra CIOCAN, Eleonora GUGUIANU, Mihai MAREȘ, Cristina RÎMBU, Mihai CARP-CĂRARE, 2015- *The prevalence of positive ESBL E. coli and Klebsiella pneumoniae strains in the dogs in the Iași paddock*, Lucrări Științifice Medicină Veterinară Timișoara, vol. 48(2), p: 74-80.

2. Andreea-Paula COZMA, Cătălin CARP-CĂRARE, Daniela POREA, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Mihai MAREȘ, MIHAI CARP-CĂRARE, 2015- *The prevalence of ESBL-producing strains of E. coli and K. pneumoniae, isolated from pets treated with antibiotics*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine, vol. 72(2), p: 406-410.

3. Andreea-Paula COZMA, Oana-Alexandra CIOCAN, Cătălin CARP – CĂRARE, Eleonora GUGUIANU, Cristina HORHOGEA, Cristina RÎMBU, Mihai MAREȘ, Mihai CARP– CĂRARE, 2016- *The prevalence of positive ESBL E. coli and Klebsiella pneumoniae strains isolated from the owners of pets*, Lucrări Științifice Medicină Veterinară Timișoara, vol. 49(3).

4. Andreea-Paula COZMA, Ioana CRIVEI, Oana Alexandra CIOCAN, Cătălin CARP-CĂRARE, Cristina RÎMBU, Eleonora GUGUIANU, Cristina HORHOGEA, Mihai CARP-CĂRARE, 2017- *The prevalence of ESBL-producing strains of E.coli , isolated from calves with colibacillosis - preliminary remarks*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine, vol. 74(1), p:129-131.

5. Andreea-Paula COZMA, Mihai CARP – CĂRARE , Cătălin CARP – CĂRARE, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Iulia ELENA MĂCIUCĂ, Dorina TIMOFTE, 2017- *CTX-M groups characterization in Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), isolated from dogs feces in two dog shelters from Moldova*, acceptat și în curs de publicare în *Lucrări Științifice Medicină Veterinară Timișoara* vol.XL.

În calitate de coautor:

1. Cristina RÎMBU, Eleonora GUGUIANU, Rita GOLBAN, Cristina HORHOGEA, Cătălin CARP-CĂRARE, Carmen CREȚU, Mariana GRECU, **Andreea-Paula Cozma**, Ramona SCUTARIU, 2016- *Aspecte privind evaluarea unor efectori umorali locali și sistemici în infecțiile bucale la pisică*, Revista Științe Agricole vol.1, pp 77-86, ISSN 1857-0003.

2. Cristina RÎMBU, Ciprian BOTEZATU, Cătălin CARP-CĂRARE, Cristina HORHOGEA, Carmen CRETU, Oana CIOCAN, **Andreea-Paula COZMA**, Cătălina SÂNDULEANU, Eleonora GUGUIANU, 2015 - Study on the Wild Boar Meat Contamination with Pathogenic Agents Involved in Foodborne Diseases, Bulletin UASVM Veterinary Medicine, vol. 72(2), p: 277-278.
3. Ioana CRIVEI, **Andreea-Paula COZMA**, S. I. BORS, Elena RUGINOSU, P. ROȘCA, D. DRUGOCIU, 2016- *Antibiotics sensitivity of isolated bacteria from dairy cows with clinical endometritis*, Lucrări Științifice Medicină Veterinară Timișoara Volumul XLIX (3), ISSN: 1221-5295.
4. Ioana CRIVEI, **Andreea-Paula COZMA**, Oana Alexandra CIOCAN, Ionuț BORȘ, Petru ROȘCA, Dan DRUGOCIU, 2017- *Preliminary remarks regarding the prevalence of ESBL-producing strains of and K.pneumoniae, isolated from cows with clinical endometritis*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine, vol.74(1), p:132-134.
5. Oana-Alexandra CIOCAN, Mihai CARP – CĂRARE, Cătălin CARP – CĂRARE, **Andreea – Paula COZMA**, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Elena Petraru, Carmen - Valentina PANZARU, 2015- *Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in β -Lactamases*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine, vol.72(2), p: 368-370.
6. Oana-Alexandra CIOCAN (MOȚCO), Alper ÇİFTÇİ, Yagmur KOÇAK, Mihai CARP – CĂRARE, Mihai MAREȘ, **Andreea-Paula COZMA**, Ioana CRIVEI, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Carmen-Valentina PANZARU, Cătălin CARP-CĂRARE, 2015- *Phenotypes of Fluoroquinolone Resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from a Romanian Hospital*, Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine., vol. LXII (1), p: 85-87.
7. Oana-Alexandra CIOCAN, Mihai CARP CĂRARE, **Andreea-Paula COZMA**, Cătălin CARP – CĂRARE, Cristina RÎMBU, Gabriela COMAN, Elena PETRARU, Carmen – Valentina PANZARU, 2015- *Isolation and Identification of Pseudomonas aeruginosa strains producing B- Lactamases (ESBL) and Carbapenemases (MBL) of human origin*, Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine., vol. LXI (2), p: 254-257.
8. Oana-Alexandra CIOCAN, Mihai CARP-CĂRARE, Cristina RÎMBU, **Andreea-Paula COZMA**, Cătălin CARP-CĂRARE, Eleonora GUGUIANU, Carmen-Valentina PANZARU, 2015- *The Incidence of dog recurrent otitis caused by strains of Multidrug-Resistant (MDR) Pseudomonas aeruginosa*, Lucrări Științifice Medicină Veterinară Timișoara, vol. XLVIII (3).
9. Oana-Alexandra CIOCAN, **Andreea-Paula COZMA**, Irina LIPOVAN (ABALASEI), Eleonora GUGUIANU, Carmen-Valentina PANZARU, Mihai MAREȘ, Mihai CARP-CĂRARE, Cătălin CARP-CĂRARE, 2015- *Antibiotics Resistance Dynamics of isolated Pseudomonas aeruginosa strains in a hospital*

from Northeastern Romania in the period 2012 – 2014, *Lucrări Științifice USAMV IAȘI, Medicină Veterinară*, vol. 58(3).

10. Oana-Alexandra CIOCAN, Cătălin CARP-CĂRARE, **Andreea-Paula COZMA**, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Elena PETRARU, Emma Cecilia STRATULAT PETERCĂ, Carmen-Valentina PANZARU, Mihai CARP-CĂRARE, 2015-*Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in Aminoglycosides*, *Lucrări Științifice USAMV IAȘI Medicină Veterinară*, vol. 58(3).

11. Paula-Maria SAFTENCU, **Andreea-Paula COZMA**, Oana-Alexandra CIOCAN, Sorin PASCA, Gheorghe SOLCAN, 2015- *A Case of Cystitis Produced by Esbl-Positive Escherichia Coli in A Male Cat*. *Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară*, vol.58.

12. Rita GOLBAN, Mihai CARP-CĂRARE, Cristina RÎMBU, Eleonora GUGUIANU, Cătălin CARP-CĂRARE, Cristina HORHOGEA, **Andreea-Paula COZMA**, 2016 - *Investigations on lymphocytes blastization mechanism as a result of stimulation with a specific antigen*, *Lucrări Științifice Medicină veterinară*, vol. 59(3), p: 270-175.