

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a  
Banatului “*Regele Mihai I al României*” din Timișoara

**Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara**



**DOMA ALEXANDRU-OCTAVIAN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Eficacitatea terapiei cu antibiotice și fenomenul  
rezistenței pe lanțul animal-om-animal la specia  
suine**

**Conducător științific**

**Prof. Dr. CRISTINA ROMEO TEODOR**

**T i m i ș o a r a**

**2021**

Banat's University of Agriculture and Veterinary Medicine  
"King Michael I of Romania" from Timișoara

**Faculty of Veterinary Medicine Timișoara**



**DOMA ALEXANDRU-OCTAVIAN**

# **DOCTORAL THESIS**

**The effectiveness of antibiotic therapy and the  
resistance phenomenon on the animal-human-  
animal chain in the swine species**

Scientific advisor

**Prof. Dr. CRISTINA ROMEO TEODOR**

**Timișoara  
2021**

## Rezumatul tezei de doctorat

### Eficacitatea terapiei cu antibiotice și fenomenul rezistenței pe lanțul animal-om-animal la specia suine

#### Prezenta teză conține:

*Listă de abrevieri*

*Rezumatele în limba Română și Engleză*

*Parte de cercetări bibliografice:* 44 pagini

*Parte de cercetări proprii:* 84 pagini

*Tabele:* 30

*Figuri:* 110

*Surse bibliografice:* 291

#### Motivația alegerii temei de cercetare

Rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă capacitatea microorganismelor de a deveni rezistente la efectul farmaconilor antimicrobieni, în special la antibiotice, dar și la antivirale, antifungice și antiprotozoarice, substanțe la care aceste microorganisme au fost sensibile anterior.

Într-o lume unde nevoia de proteină de origine animală a crescut imens datorită creșterii logaritmice a populației, în mod logic și industria creșterii animalelor de rentă a beneficiat de uzul masiv al antibioticelor. Antimicrobienele au revoluționat practica medicală, astfel afecțiuni care în trecut erau mortale au devenit azi banale și pot fi tratate în scurt timp.

Acest avantaj, în prezent este supus riscului în special din cauza utilizării excesive sau inadecvate a antimicrobienelelor, ceea ce a dus la creșterea cazurilor de apariție și de răspândire a bacteriilor multirezistente. RAM este o consecință a evoluției, a selecției naturale și mutației genetice, această mutație fiind ulterior transmisă conferind rezistență, ceea ce indică o problemă globală, cu impact direct asupra sănătății animalelor și oamenilor, fiind considerată un fenomen cu risc zoonotic. Conform unui raport ONU mediul natural a devenit un rezorv al reziduurilor de antibiotice, agenți patogeni rezistenți și alte molecule cu proprietăți antimicrobiene care sporesc răspândirea genelor rezistente în mediul microbial”. Prin urmare, rezistența la antimicrobiene (RAM) a devenit o prioritate de prim ordin pentru Comisia Europeană, astfel că, a lansat un plan de acțiune bazat pe o abordare holistică, în conformitate cu inițiativa „*One health*”, menită să abordeze riscurile tot mai mari reprezentate de RAM. În România încă se fac eforturi pentru colectarea datelor primare ale rezistenței la animale pentru racordarea la sistemele oficiale de monitorizare a fenomenului.

Studiul doctoral se axează în principal pe realizarea unei cercetări asupra eficacității terapiei cu antibiotice și a fenomenului de rezistență pe lanțul animal-om-animal la specia suine, iar principalul obiectiv este: monitorizarea fenomenului de rezistență pe lanțul animal-om în ferme de suine din zona de Vest a României; evaluarea eficacității tratamentelor și impactul lor asupra efectivelor de animale precum și repercursiunile asupra sănătății publice. În forma

propusă de noi această temă nu a abordată de nici o cercetare română din medicina veterinară, ceea ce a oferit motivația prezentei teze de doctorat.

**Domenii de studiu:** *medicină veterinară, medicină umană, biologie moleculară.*

**Subdomenii:** *farmacologie, bacteriologie, biologie moleculară, statistică descriptivă.*

### **Importanța și actualitatea temei**

Utilizarea pe scară largă a substanțelor antimicrobiene atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară s-a accentuat, ceea ce a condus la o accelerare în apariția și răspândirea RAM. Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA) în colaborare cu Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor (ECDC), Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) și Laboratorul de referință al UE pentru rezistența antimicrobiană (EURL-AMR) coordonează colectarea datelor privind utilizarea de agenți antimicrobieni de uz veterinar în statele membre. Ratele de rezistență din UE au variat de la un nivel foarte scăzut de (0%), în Islanda, la maxim 57%, în România, situația este din păcate una îngrijorătoare și au fost parcurși prea puțini pași (în comparație cu celelalte state europene) către controlul rezistenței microbiene.

Conform studiilor animalele din crescătoriile Europei consumă mai multe antimicrobiene decât oamenii, iar carnea de porc are cea mai mare concentrație de antibiotice. Un fapt esențial este că, animalele pot servi drept mediatori, rezervoare și diseminatori de tulpini rezistente și/sau ale genelor antibioretistenței. Utilizarea imprudentă a antimicrobielenor la animale alături de relele practici poate duce finalmente la creșterea morbidității și mortalității. Răspândirea și transmiterea genelor rezistenței este încrucișată și demonstrată ca fiind posibilă între: om – animal, animal – om, animal – mediu.

Prezenta teză doctorală își propune să aducă informații noi și de actualitate în gestionarea fenomenului de rezistență de la noi din țară prin, utilizarea practicilor de management care reduc semnificativ expunerea și analize microbiologice și moleculare pe gene specifice. Actualitatea studiului nostru este dată de cercetările de biologie moleculară și gaz-cromatografie asupra agenților patogeni multi-rezistenți din familia *Enterobacteriaceae*, genul *Escherichia*, tipul *Escherichia coli* întâlniți în diferite afecțiuni la subiecții umani și la suine.

**Cuvinte cheie:** *antibioretistență, E.coli, qnr, acizi grași, chinolone, suine, om.*

**Keywords:** *antibiotic resistance, E.coli, qnr, fatty acids, quinolones, pigs, humans*

### **Locul desfășurării experimentelor:**

- Complexul de laboratoare de cercetare „Horia Cernescu” (CLCCH) – Laboratorul de cercetări toxico-farmacologice (B.12), infrastructură finanțată prin proiectul RO 05. Cod SMIS-CSNR 2669 (USAMVBT).
- Laboratorul disciplinei de farmacologie – FMV Timișoara.
- Laboratorul disciplinei de boli infecțioase – FMV Timișoara.
- Laboratorul disciplinei de anatomie patologică și necropsie – FMV Timișoara.
- Laboratorul disciplinei de matematica și bio-statistica USAMVB Timișoara.
- Laboratorul departamentului toxicologie din cadrul Spitalului Universitar „Pius Brînzeu” Timișoara.
- Laboratorul de biologie celulară și moleculară – UMF „Victor Babes” Timișoara.

**Metodologia aplicată:**

- *Identificarea agenților patogeni – sistemului multi-test API 20E (Biomerieux);*
- *Sensibilitatea / rezistența bacteriană – tehnica standardizată de difuzare a discului Kirby-Bauer și interpretare CLSI-2009 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009);*
- *Analiza acizilor grași din membrana bacteriană – metoda GC-MS cu aparatul de analiză cromatografică Saturn 2000 (Varian);*
- *Izolarea ADN-ului bacterian – Mini-Kit PureLink® Genomic DNA*
- *Amplificarea ADN-ului, PCR (Polymerase Chain Reaction) Biometra™, Analytik Jena.*
- *Analiza statistică – programului IBM SPSS Statistics (Version 2.1) și ANOVA(t-test);*

În conformitate cu instrucțiunile în vigoare teza este compusă din două părți mari:

- *Partea generală – Stadiul actual al cunoașterii*
- *Cercetările proprii*

## **Partea generală**

### **Stadiul actual al cunoașterii**

Este extinsă pe **44** de pagini (32,8% din teză) și structurată într-un capitol mare cu **10** subcapitole.

#### **Capitolul 1. Considerații asupra aparatului digestiv la suine**

**Subcapitolul 1.1.** se face o *Scurtă descriere* a tractul digestiv. Sistemul digestiv la porc are capacitatea de a converti hrana de origine vegetală și/sau animală în substanțe nutritive înalt digerabile, anatomia și fiziologia sa fiind foarte similare cu cea a omului.

**În subcapitolele 1.2, 1.3., 1.4. și 1.5.** sunt prezentate principalele afecțiuni de natură medicală și/sau ca urmare a tehnopatiilor a segmentelor digestive la porc (ileita, ulcerele gastrice, prolapsul rectal și herniile, constipația, sindromul diareic, Stresul neonatal și de întârțare la purcei, sindromul de pică).

**Subcapitolul 1.6.** este dedicat principalelor *boli de natura bacteriene și virale cu manifestări digestive la suine întâlnite frecvent în România.* În subcapitol sunt prezentate principalele afecțiuni bacteriene și virale cu manifestări digestive, în special diaree.

**Subcapitolul 1.7.** tratează *transmiterea rezistenței / mecanisme și structura bacteriană.*

Bacteriile au în general structuri interne similare, dar cele externe sunt foarte diferite. Citoplasma celulei bacteriene conține ADN-ul cromozomial, ARN-m, ribozomi, proteine și metaboliți, natura chimică a peretelui celular bacterian fiind cea care determină proprietățile sale tinctoriale. În partea dedicată *caracterizării generale a antibioticelor* sunt prezentate grupele cele mai utilizate a.u.v. de bacteriostatice și bactericide, precum și interacțiunile lor, instalarea și efectele rezistenței bacteriene la antibiotice, mecanismele și fazele specifice (*alterarea țintei sau structurii enzimatică. acumularea scăzută a antibioticului în celulele bacteriene rezistente*) care stau la baza instalării rezistențelor, *adaptarea genetică (prin mutații genetice și selecție etc.).*

**Subcapitolul 1.8.** prezintă *analiza tendințelor în evoluția rezistențelor la antibiotice.* Cele mai multe rapoarte se referă la tendința de creștere a utilizării substanțelor antimicrobiene folosite în doze subterapeutice la animalele de rentă și păsări. Deci, antibioticele au ajuns în

hrana noastră dar și în apa potabilă și în timp rezistența bacteriană ia amploare. Din fericire în Uniunea Europeană folosirea de rutină în hrana animalelor a antibioticelor este interzisă.

**Subcapitolul 1.9.** tratează *impactul asupra mediului al utilizării imprudente a antiinfecțioaselor*. Concentrațiile de antibiotic acumulate în mediul extern vor exercita presiune selectivă asupra bacteriilor din mediu și pot favoriza, transferul genelor rezistente, contribuind la crearea „*rezistomului*”, un amestec de trăsături genetice ale rezistenței. Un domeniu de interes este efectul pe termen lung al reziduurilor de antibiotice în mediul înconjurător

**Subcapitolul 1.10.** enumeră *programele naționale și internaționale de antirezistență la antibiotice*. Agențiile naționale sau internaționale sunt însărcinate în special cu monitorizarea consumului de antimicrobiene și de evaluare a ratelor rezistenței la animalele de rentă, în produsele alimentare și/sau la om.

## Cercetările proprii

Această parte se extinde pe 84 pagini (reprezentând 67,2% din teză) este compus din patru capitole mari și capitolul de concluzii generale:

### Capitolul 2. Studiul evoluției mortalităților în 49 ferme din vestul României

#### *Obiectivul studiului*

Mortalitatea porcilor din fermele comerciale de pe întregul mapamond, reprezintă, o pierdere însemnată care, nu poate și nu va fi eliminată în totalitate, ci doar diminuată la niște valori suportabile din punct de vedere economic. Cauzele acestor pierderi sunt dependente de factori care pot varia în funcție de managementul unităților, starea de sănătate a indivizilor, condițiile de cazare și de microclimat. În acest scop, am realizat o comparație între cele două tipuri de ferme întâlnite în zona luată în studiu pe modele de creștere a porcului în sistem intensiv din vestul României, unde, am evaluat costurile cu tratamentul și prevenția și am monitorizat efectivele de animale și rata mortalității porcilor din ferme.

#### *Locul desfășurării studiului:*

Experimentul s-a desfășurat pe parcursul unui an calendaristic, s-au luat în calcul peste jumătate de milion de suine, din **49 de unități** de creștere structurate în două categorii: fermele de capacitate mare (de tip A) și ferme de capacitate mică (de tip B). Unitățile sunt amplasate în partea de câmpie a zonei luate în studiu: **35 de unități** în sud-vestul județului Timiș, **13 unități** în nord-vestul județului Arad și **o unitate** în vestul județului Caraș Severin.

#### *Analiza statistică*

Prelucrarea datelor și interpretarea statistică s-a realizat cu ajutorul programului IBM SPSS Statistics (Version 2.1) și s-au luat în calcul date cu privire la procentul de mortalitate din unități, consemnat de fiecare fermier pentru fiecare hală de producție în parte. De asemenea în aceeași analiză s-au contorizat valoarea tratamentelor precum și a vaccinărilor efectuate, precum și impactul lor asupra mortalității în unitățile luate în studiu.

#### *Rezultatele*

Din calculele economice ale fermierilor care dețin unități de creștere a porcului în zona de vest, reiese că mortalitatea acceptabilă nu trebuie să depășească 5,5%, aceasta fiind valoarea maxim admisă pentru ca fermele de suine să fie profitabile.

Analiza statistică cu privire la evoluția mortalității în fermele luate în studiu s-a situat în jurul valorii de 4,44% astfel că economic, fermele îndeplinesc baremul de rentabilitate.

În urma cercetărilor noastre, urmărind loturi de porci din ferme diferite, începând de la faza de înțărare până la sacrificare (timp aproximativ 6 luni), au rezultat valori procentuale de mortalitate de: 4,23% în fermele de tip B, și de 4,51% în fermele de tip A.

Gruparea fermelor după o analiză economică este esențială în zilele noastre, pentru a evidenția impactul bugetar al tratamentelor în raport cu eficiența lor.

La fel ca și în cazul evaluării mortalității am clasificat fermele după nivelul cheltuielilor cu medicamentele utilizate în prevenția și tratamentul porcilor. Fermele au fost clasificate în patru grupe, în funcție de nivelul cheltuielilor și valoarea tratamentelor aplicate:

- Grupa I cuprinsă în intervalul: 0 – 6,26 unități pecuniare / individ.
- Grupa II cuprinsă în intervalul: 6,27 – 12,52 unități pecuniare / individ.
- Grupa III cuprinsă în intervalul: 12,53-18,79 unități pecuniare/individ.
- Grupa IV cuprinsă peste valoarea: 18,80 unități pecuniare / individ.

După cum se poate observa, primele trei grupe se pot încadra în categoria cheltuielilor eligibile care nu pun o presiune mare asupra bugetului de investiție prevăzut pentru acțiunile de combatere și prevenire a bolilor din cadrul unităților de creștere a porcilor. Mortalitatea înregistrată la adulți a fost în mod constant mai mare în comparație cu mortalitatea de la categoria tineret, fapt semnalat și de către alți autori. Incidența crescută a mortalității apare în principal la porcii mai în vârstă și valoroși economic și nu poate fi prevăzută.

În fermele de tip A, la data studiului, mortalitatea a variat semnificativ, implicit cheltuielile cu tratamentul și prevenția afecțiunilor care a variat de la 6 unități pecuniare / individ, până la 11,9 unități pecuniare / individ. În fermele de tip B limita maximă admisă a mortalității nu a fost depășită, dar se poate observa faptul că, în aceste unități, cheltuielile cu tratamentul per animal au fost mari. Prin corelarea acestor date cu privire la impactul tratamentelor efectuate asupra evoluției mortalității din ferme, am obținut date semnificative statistic, iar valoarea lui  $p \leq 0,01$ . Acest fapt demonstrează că un tratament aplicat corect este eficient în menținerea unui parg scăzut al mortalității. Aceste rezultate confirmă faptul că în cazul fermelor de suine din studiul nostru este necesară o abordare mult mai severă asupra măsurilor de biosecuritate implementate în aceste ferme pentru eliminarea surselor care generează cheltuieli suplimentare și implicit, diminuarea profitului.

### **Capitolul 3 - Studiul antibioretistenței în fermele de suine din vestul României**

#### ***Locul desfășurării studiului***

În cadrul acestei cercetări au fost selectate zece unități cu sistem intensiv de creștere, structurate pe categorii de vârstă și greutate, aflate în județele Timiș și Arad, unde au fost examinate cazurile de enterită colibacilară.

#### ***Motivația studiului***

Afecțiunile digestive la suine cauzate de o serie de bacterii comensale sau patogene pot determina apariția unor simptome cu impact major asupra sporului de creștere, asupra calității cărnii, și, implicit diminuarea profitului economic. La nivel mondial aceste bacterii produc pierderi majore în ferme, din totalitatea agenților patogeni, *E. coli*, reprezintă un factor important în apariția sindromului enteric, producând pagube materiale însemnate prin

scăderea productivității, asociate cu creșterea costului de producție și indice scăzut al profitabilității

### **Obiectivul**

În acest experiment au fost vizate aspecte ce țin de izolarea tulpinilor de *E.coli* și încadrarea în gen pe baza unor proprietăți biochimice, evaluarea profilului de sensibilitatea și de rezistență față de diverse substanțe antimicrobiene și interpretarea statistică a rezultatelor prin programul Anova (*t*-test).

### **Stabilirea diagnosticului**

Diagnosticul cert s-a pus pe baza semnelor clinice evidențiate de personalul medical veterinar din unități, coroborate cu examinarea morfopatologică și examenele de laborator prin identificarea agentului patogen efectuate în cadrul disciplinelor de necropsie și boli infecțioase din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara.

### **Izolarea agentului etiologic**

Analizele de bacteriologie s-au efectuat pe **167 probe biologice** (porțiuni de intestin subțire, ficat, rinichi, pulmon recoltate de la porci). Din materialul biologic s-au prelevat probe cu ajutorul pipetei Pasteur, care ulterior au fost introduse în bulion, și de aici, cu ajutorul ansei Drigalsky s-au transferat pe agar nutritiv și s-au turnat în placi Petri.

Din probele examinate: 75,44% = pozitive, 10,77% = hemolitice, 13,79% = negative.

### **Metoda de testare și interpretare a susceptibilității**

Pentru acest studiu s-au luat în calcul doar probele pozitive nehemolitice care au fost testate prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, având ca principiu de funcționare determinarea sensibilității sau a rezistenței unei culturi bacteriene față de un antibiotic. Această metodă se realizează în placi Petri cu medii solide, unde se va însămânța cultura bacteriană. Pe suprafața mediului se aplică discurile cu antibiotice astfel că, în jurul acestora se va forma câte un halou de difuziune bazat pe gradient de concentrație locală a antibioticului. După formarea godeului din jurul comprimatului cu substanță activă se măsoară diagonala acestuia, iar rezultatul se compară cu tabelul interpretativ CLSI/2009 (Clinical Laboratory Standard Institute USA, 2009). Rezultatele au fost împărțite în patru categorii după cum urmează: sensibil (*susceptibil-S*), moderat sensibil (*intermediar-I*), rezistent (*R*), *non-susceptibil (NS)*.

### **Analiza statistică**

Evaluarea varianței între grupuri a fost stabilită utilizând ANOVA bidirecțională, pentru probe, cu testul de comparație multiplă al lui Tukey, având în vedere că diferențele sunt furnizate statistic atunci când  $p < 0,05$  sau mai puțin. Software-ul aplicat a fost Graph Pad Prism 6.0 pentru Windows. (Graph Pad Software, San Diego, SUA). Valorile au fost exprimate ca medie  $\pm$ SEM (Standard Error Media).

### **Rezultatele**

Rezistența la antibiotice reprezintă pentru sănătatea publică o mare îngrijorare, deoarece agenții patogeni rezistenți la antibiotice proveniți de la animale pot fi patogeni și pentru om. Transmiterea lor se poate realiza cu ușurința prin lanțul alimentară, sau raspândiți pe scară largă în mediul înconjurător prin intermediul deșeurilor provenite de la animale. Evoluția fenomenului de rezistență din cele două județe (Timiș - **84 de probe pozitive din 7 ferme** și Arad – **42 de probe pozitive din 3 ferme**) a tulpinilor de *E. coli* izolate de la porci, în jurul vârstei de înțarcare sau post-înțarcare, față de cele **11 antibiotice**



Evoluția procentuală a rezistenței / antibiotic în fermele din cele două județele **Timiș**: Doxiciclină (10%), Lincospectin (9%), Colistin (6%), Gentamicină (4%), Neomicină (13%), Ciprofloxacina (3%), Enrofloxacină (5%), Amoxicilină / acid clavulanic (4%), Florfenicol (8%), Tetraciclină (14%), Eritromicină (14%).

Evoluția procentuală a rezistenței / antibiotic în fermele din cele două județele **Arad**: Doxiciclină (14%), Lincospectin (15%), Colistin (5%), Gentamicină (3%), Neomicină (9%), Ciprofloxacina (2%), Enrofloxacină (4%), Amoxicilină / acid clavulanic (10%), Florfenicol (7%), Tetraciclină (16%), Eritromicină (15%).

#### **Capitolul 4. Corelația dintre rezistența la antibiotice și compoziția lipidică bacteriană la *Enterobacteriaceae***

##### ***Motivația studiului***

Ne-am propus să realizăm o corelație dintre rezistența la antibiotice și compoziția lipidică bacteriană bazată pe funcția și structura stratului bi-lipidic al celulei bacteriene aflate în strânsă legătură cu pasajul antimicrobienele prin membrane.

##### ***Obiectivul***

Acest studiu are ca scop identificarea agentului patogen cu ajutorul sistemului multitest API 20E; stabilirea nivelului de rezistență la acțiunea substanțelor antimicrobiene prin metoda disc-difuzimetrică și determinarea acizilor grași din membrana bacteriană prin metoda de identificare a esterilor de metil cu ajutorul aparatului GC-MS.

##### ***Locul desfășurării studiului***

Probele au fost recoltate în luna iunie 2016 dintr-un complex de creștere a suinelor din județul Arad, am prelevat un număr de **15 probe** de intestin de la suinele care erau monitorizate în prealabil și au manifestat simptome specifice enteritei colibacilare. Examinarea și testarea lor s-a realizat cu ajutorul unui sistem biochimic multi-test de identificare a microorganismelor API 20E și prin metoda disc-difuzimetrică în cadrul laboratorului de boli infecțioase (FMVT). Analiza acizilor grași din membrana bacteriană s-a realizat în cadrul laboratorului de toxicologie din cadrul Spitalului Universitar Clinic Județean de Urgență "Pius Brînzeu" Timișoara.

##### ***Metodele utilizate***

Identificarea agentului patogen ajutorul unui sistem biochimic multi-test de identificare a microorganismelor API 20E. Componentele sistemului sunt fabricate din material plastic, tăvița permite asigurarea umidității necesare testării, iar galeria pe care se găsesc cele 20 de compartimente se pot observa modificări colorimetrice în funcție de prezența sau absența agentului patogen. Comparativ cu metodele clasice, utilizarea sistemelor multitest de identificare sunt mai rapide și mult mai precise / sigure.

Analiza acizilor grași din membrana bacteriană s-a realizat prin gaz cromatografie care poate detecta compuși ce se pot vaporiza, și apoi poate detecta concentrații de ordinul ppm sau ppb. Microorganismele, izolate și cultivate pe medii selective în condiții optime de temperatură și umiditate au fost supuse testării în vederea evidențierii acizilor grași din membrana bacteriană. Pentru aceste determinări sunt necesare cel puțin 4 manopere preliminare (saponificare, metilare, extracție, spălare) și tot atâția reactivi. Aparatura de analiză cromatografică utilizată a fost un Varian Saturn 2000 GC / MS cu un CP-3800 GC. Aceste componente combinate creează o platformă ca un GC versatil și un sistem MS

flexibil. Ambele componente acceptă o gamă variabilă de opțiuni extrem de productive și ușor de utilizat. Datele electronice sunt stocate pe hard disk, iar compoziția esterului metilic al acidului gras al probei este comparat cu o bază de date stocată folosind modelul Sherlock software de recunoaștere unde se găsesc peste 100.000 de analize.

### **Rezultatele**

Investigațiile fiind realizate doar pe probe prelevate de la suine tratate cu antibiotice și unde s-a confirmat ineficiența tratamentelor, prezentul studiu încearcă să aprofundeze corelația dintre rezistența dobândită și compoziția în acizii grași prezenți în membrana bacteriană de *E. coli* (care au manifestat rezistență la antibioticele uzuale utilizate în tratamentul porcilor). Din totalul probelor testate, **11** au fost pozitive cu evoluții variate de susceptibilitate. Rezultatele identificării acizilor grași extrași cu ajutorul metanolului, au fost studiate utilizând cromatografia cu gaze. Cuantificarea rezultatelor din cele 11 cromatograme (cadrane de colectare) și evidențierea acizilor grași din membrana bacteriană de *E. coli*, în funcție de timpul de retenție au determinat cantității de acizi grași comparativ cu rata de susceptibilitate a antibioticelor utilizate în acest studiu a fost mai mare în fenotipul S comparativ cu fenotipul R, fapt descoperit și de alți cercetători, identificându-se diferențe semnificative din punct de vedere cantitativ între compoziția acizilor grași ai tulpinilor sensibile și rezistente.

Cel mai notabil fapt a fost că, la tulpinile rezistente am observat scăderi proporționale ale acizilor comparativ cu tulpinile sensibile de *E. Coli*. Doar în cadrul probei cu numărul șase se poate observa prezența acidului metil-(Z)-11-tetradecenoat, iar în urma evaluării susceptibilității prin metoda disc difuzimetrică, această probă a prezentat cea mai scăzută rată a fenomenului de rezistență antimicrobiană.

## **Capitolul 5. Evaluarea comparativă a genelor *qnrA*, *qnrB* și *qnrS* pe *Enterobacteriaceae* rezistente la ciprofloxacina în unități de suine și un spital din vestul României**

### **Motivația studiului**

În ultima perioadă, fenomenul rezistenței la antibiotice a luat amploare, astfel că, medicii întâmpină dificultăți în practică din prisma acestuia prin scăderea eficacității antimicrobiene și dezvoltarea mecanismelor de adaptare / apărare a microorganismelor. Grupul chinolonelor a fost utilizat pentru profilaxia împotriva infecțiilor Gram negative atât la oameni, cât și la animale, dar impactul asupra mecanismelor de rezistență ale acestui grup important necesită totuși o explorare suplimentară. Tehnicile actuale de genetică moleculară, pot facilita activitatea de cercetare în vederea evidențierii genelor care ne pot ajuta la descifrarea impactului ecologic al fenomenului de rezistență asupra sănătății. În aceste cazuri, utilizarea metodologiei PCR (Polymerase Chain Reaction) oferă o detectare simplă, rapidă și precisă a profilurilor de rezistență la antibiotice, devenind o metodă utilizată în mod regulat de diagnostic și supraveghere a antibioretistenței în studiile epidemiologice și ecologice.

### **Obiectivul**

Deoarece ne-am preocupat de rezistența grupului chinolonelor care a apărut în vestul României la oameni și animale, prezentul studiu încercă să identifice cazurile rezistente la CIP și a monitorizat plasmidele *qnrA*, *qnrB* și *qnrS* în probe de *E. coli*, de la om și suine, utilizând tehnica moleculară.

### **Locul desfășurării studiului**

Experimentul s-a desfășurat în perioada Ianuarie 2019 – Ianuarie 2020, în zona de vest a României (Județele Timiș și Arad), o arie bine dezvoltată din punct de vedere al industriei zootehnice axată pe creșterea suinelor în sistem intensiv. Pentru acest studiu am optat pentru unitățile mari de creștere a suinelor unde cazuistica este de obicei diversificată, iar incidența afecțiunilor colibacilare a fost identificată ca și crescută. De asemenea am fost interesați și de personalul care își desfășoară activitatea în aceste ferme, numărul angajaților fiind proporțional cu mărimea unităților.

### **Recoltarea probelor**

Examenul a fost efectuat pe material biologic proaspăt recoltat de la suine din conținutul intestinal au fost izolate culturi pure de *E. coli*. Probele de la oameni pentru prelucrarea de laborator au fost furnizate de la un mare spital din Timișoara, probele de sânge fiind colectate în vacutainer K3-EDTA de colectare a sângelui. Examinarea la om s-a realizat pe material biologic, din cultura pură de *E. coli* prelevat în PBS (tampon fosfat salin) din plăcile de cultură.

### **Metode utilizate**

Identificarea Sensibilitatea / rezistența bacteriană a fost testată prin tehnica standardizată de difuzare a discului Kirby-Bauer, pentru **21 de antibiotice**, utilizate în mod obișnuit în medicina umană precum și la **15 antibiotice** (și asociații) utilizate frecvent în uzul veterinar, pe 147 tulpini izolate de *E. coli* prelevate de la oameni și respectiv 53 de tulpini izolate la porcine. Interpretarea rezistenței la antibiotice a fost efectuată prin Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Izolarea ADN-ului bacterian s-a efectuat folosind Mini-Kit PureLink® Genomic DNA Minim, conform protocolului descris de producător. Analiza calității și cuantificării ADN-ului bacterian a fost efectuată utilizând spectroscopia UV.

Puritatea ADN-ului, a fost analizată Densitatea Optică (OD) la 260/280 pe un spectrofotometru ScanDrop nano-volum (Analytik Jena, Jena, Germania), am luat în considerare doar probele cu puritate ADN de aproximativ 1,8, iar valorile înregistrate sub acest nivel indicând contaminarea probelor. Amplificarea ADN-ului a fost efectuată în PCR pe un termociclator (Biometra™, Analytik Jena, Jena, Germania), timp de 35 de cicluri, utilizând FIRESol® Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) și primerii specifici pentru genele *qnrS*, *qnrA* și *qnrB*. Analiza statistică a datelor a fost efectuată folosind funcția IBM SPSS Statistics (Versiunea 2.1.) și funcția Crosstabs.

### **Rezultatele**

Rezultatele TSA izolatele de la suine, indică prezența tulpinilor multirezistente din 53 de probe analizate, **15 izolate** prezentau rezistență la CIP, iar la oameni din **147 de probe** au prezentat, de asemenea, niveluri ridicate de rezistență la CIP, dar proporțional mai mici în comparație cu cele de la porcine.

Analiza calității și cuantificarea ADN-ului extras din culturile bacteriene s-au luat în considerare pentru analiza PCR numai probele cu o puritate a ADN-ului de aproximativ 1.8 sau mai mare. În consecință, din cele **15 de probe de suine (S)** luate în studiu, numai **12** au reprezentat material genetic corespunzător, iar la subiecții umani (H) **15 probe** de ADN din totalul de **24 de probe** prelevate din mediul de cultură.

Prezența genei *qnrS* (417pb (pb=perechi bază)) a fost identificată la **13** dintre subiecții umani, precum și la toate cazurile de suine luate în studiu. Amplificarea PCR pentru gena

*qnrB* a evidențiat prezența acesteia la **9** dintre pacienți și la toate cazurile de izolate obținute de la suine. În ceea ce privește gena *qnrA*, aceasta a fost observată numai la **3** dintre izolatele obținute dintre subiecții umani, nu și la suine.

Astfel, în culturile de *E. coli* izolate de la subiecții umani *qnrS* a fost depistat la 52% din cazuri, *qnrB* la 36% din cazuri și *qnrA* la 12% din cazuri. La suine, *qnrS* și *qnrB* au fost evidențiate la 100% din cazuri.

Studiul de față indică o prevalență crescută a genelor de rezistență *qnrA*, *qnrB* și *qnrS* la chinolone atât în cazul subiecților umani cât și în cazul suinelor. Ca o diferențiere între cele două situații este prezența genelor *qnrA* doar la oameni în proporție de 12%.

Acest fapt atrage după sine ipoteza contactului direct sau indirect al acestor subiecți cu concentrații scăzute de ciprofloxacina, care poate determina creșterea rezistenței prin prezența plasmidei *qnrA*, mecanism care este cunoscut că facilitează supraviețuirea germenilor patogeni de *E. coli*.

Ultima parte a tezei este dedicată *Concluziilor finale, îndrumărilor pentru practicieni și relevarea aspectelor de originalitate / noutate* din prezenta teză

Din cercetarea noastră cele mai importante aspecte de noutate sunt observațiile:

- *Unitățile de creștere a suinelor de tip B (de mică capacitate) au rata mortalității mult mai scăzută comparativ cu unitățile de tip A (de mare capacitate);*
- *Evoluția fenomenului de rezistență este dependentă de localizarea fermelor și managementul terapeutic din unități;*
- *Acidului metil-(Z)-11-tetradecenoat a fost prezent doar în probele cu cea mai scăzută rată identificată a fenomenului de rezistență antimicrobiană;*
- *Gena principală *qnrA* (516 pb), nu a fost găsită la suine;*
- *Genele *qnrA*, (12%), *qnrB* (36%) și *qnrS* (52%) prezente în probele umane și a *qnrB* și *qnrS* la porcine pot facilita supraviețuirea agenților patogeni sub acțiunea antimicrobienilor din grupul chinolonelor,*
- *Tratamentele cu ciprofloxacina pot facilita supraviețuirea agenților patogeni, atât în practica veterinară cât și în protocoalele terapeutice umane. Astfel, se confirmă ipoteza transmiterii rezistenței pe lanțul alimentar om - animal - om.*

## PhD Thesis Summary

### **The effectiveness of antibiotic therapy and the resistance phenomenon on the animal-human-animal chain in the swine species**

#### **This PhD thesis contains:**

*List of abbreviations*

*Abstracts in Romanian and English*

*Part of bibliographic research:* 44 pages

*Part of Own research:* 84 pages

*Tables:* 30

*Figures:* 110

*Bibliographical sources:* 291 titles

#### **Motivation for choosing the research theme**

Antimicrobial resistance (AMR) is the ability of microorganisms to become resistant to the effect of antimicrobial pharmacons, especially antibiotics, but also to antivirals, antifungals and antiprotozoals, substances to which these microorganisms have been previously sensitive. In a world where the need for animal protein has increased enormously due to logarithmic population growth, logically the livestock industry has also benefited from the massive use of antibiotics. Antimicrobials have revolutionized medical practice, so conditions that were deadly in the past have become commonplace today and can be treated in a short time.

This advantage is currently at risk, in particular due to the excessive or inappropriate use of antimicrobials, which has led to an increase in the occurrence and spread of multidrug-resistant bacteria. AMR is a consequence of evolution, natural selection and genetic mutation, this mutation being subsequently transmitted giving resistance, which indicates a global problem, with a direct impact on animal and human health, being considered a phenomenon with zoonotic risk.

According to an UN report, the natural environment has become a reservoir of antibiotic residues, resistant pathogens and other molecules with antimicrobial properties that increase the spread of resistant genes in the microbial environment. Therefore, antimicrobial resistance (AMR) has become a top priority for the European Commission, so it has launched an action plan based on a holistic approach, in line with the One Health initiative, which aims to address growing risks largely represented by AMR. In Romania, efforts are still being made to collect primary data on animal resistance for connection to official monitoring systems for the phenomenon.

The doctoral study focuses mainly on research on the effectiveness of antibiotic therapy and the phenomenon of resistance on the animal-human-animal chain in swine, and the main objective is: monitoring the phenomenon of resistance in the animal-human chain in swine farms in the western area of Romania; assessing the effectiveness of treatments and their

impact on livestock as well as the repercussions on public health. In the form proposed by us, this topic was not addressed by any Romanian research in veterinary medicine, which provided the motivation for this doctoral thesis.

**Study field:** *veterinary medicine, human medicine, molecular biology.*

**Subdomains:** *pharmacology, bacteriology, molecular biology, descriptive statistics*

### **The importance and actuality of the topic**

The widespread use of antimicrobials in both human and veterinary medicine has intensified, leading to an acceleration in the emergence and spread of AMR. The European Medicines Agency (EMA) in collaboration with the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), the European Food Safety Authority (EFSA) and the EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AMR) coordinate the collection of data on the use of antimicrobial agents for veterinary use in the Member States.

European Unions' resistance rates ranged from a very low level of (0%) in Iceland to a maximum of 57% in Romania, the situation is unfortunately a worrying one and too few steps have been taken (compared to other European countries) to control microbial resistance.

According to studies, animals in European farms consume more antimicrobials than humans, and pork meat has the highest concentration of antibiotics. An essential fact is that animals can serve as mediators, reservoirs and disseminators of resistant strains and / or antibiotic resistance genes. Reckless use of antimicrobials in animals along with bad practices can ultimately lead to increased morbidity and mortality. The spread and transmission of resistance genes is crossed and demonstrated as possible between: human - animal, animal - human, animal - environment.

This doctoral thesis aims to bring new and up-to-date information in the management of the resistance phenomenon in our country by using management practices that significantly reduce exposure and microbiological and molecular analysis on specific genes. The topicality of our study is given by molecular biology and gas chromatography research on multi-resistant pathogens of the *Enterobacteriaceae* family, genus *Escherichia*, type *Escherichia coli* found in various diseases in human subjects and swine.

**Keywords:** *antibiotic resistance, E.coli, qnr, fatty acids, quinolones, pigs, humans*

### **Location of the experiments:**

- “Horia Cernescu” research laboratory complex (CLCCH) - Toxic-pharmacological research laboratory (B.12), infrastructure financed by the RO 05 project. SMIS-CSNR Code 2669 (USAMVBT).
- Laboratory of the pharmacology discipline - FMV Timișoara.
- Laboratory of the discipline of infectious diseases - FMV Timișoara.
- Laboratory of the discipline of pathological anatomy and necropsy - FMV Timișoara.
- The laboratory of the mathematics and bio-statistics discipline USAMVB Timisoara.
- The laboratory of the toxicology department within the "Pius Brînzeu" University Hospital Timișoara.
- Laboratory of cellular and molecular biology - UMF "Victor Babes" Timișoara

**Applied methodology:**

- *Identification of pathogens - API 20E multi-test system (Biomérieux);*
- *Bacterial sensitivity / resistance - standardized Kirby-Bauer disc diffusion technique and CLSI-2009 interpretation (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009);*
- *Analysis of fatty acids from the bacterial membrane - GC-MS method with the Saturn 2000 chromatographic analysis apparatus (Varian);*
- *Isolation of bacterial DNA - PureLink® Genomic DNA Mini-Kit*
- *DNA amplification, PCR (Polymerase Chain Reaction) BiometraTM, Analytik Jena.*
- *Statistical analysis - IBM SPSS Statistics (Version 2.1) and ANOVA (t-test);*

According to the instructions in force, the thesis is composed of two main parts:

- *General part - The current state of knowledge*
- *Own research*

## **The general part**

### **Current state of knowledge**

It is extended on **44** pages (32.8% of the thesis) and structured in a large chapter with **10** subchapters.

#### **Chapter 1. Considerations on the digestive tract in pigs**

**Subchapter 1.1.** a *Brief description* of the digestive tract is given. The digestive system in pigs has the ability to convert food of plant and / or animal origin into highly digestible nutrients, its anatomy and physiology being very similar to that of humans.

**In subchapters 1.2., 1.3., 1.4. and 1.5.** the main medical conditions are presented and / or as a result of technopathies of the digestive segments in pigs (ileitis, gastric ulcers, rectal prolapse and hernias, constipation, diarrhea syndrome, neonatal and weaning stress in piglets, spike syndrome).

**Subchapter 1.6.** is dedicated to the main *bacterial and viral diseases with digestive manifestations in pigs commonly found in Romania*. The subchapter presents the main bacterial and viral diseases with digestive manifestations, especially diarrhea.

**Subchapter 1.7.** treats the *transmission of resistance / mechanisms and bacterial structure*

Bacteria generally have similar internal structures, but external ones are very different. The cytoplasm of the bacterial cell contains chromosomal DNA, mRNA, ribosomes, proteins and metabolites, the chemical nature of the bacterial cell wall being what determines its tinctorial properties. In the part dedicated to the *general characterization of antibiotics* are presented the most used groups a.u.v. of bacteriostatics and bactericides, as well as their interactions, installation and effects of bacterial resistance to antibiotics, specific mechanisms and phases (*alteration of the target or enzymatic structure. low accumulation of antibiotic in resistant bacterial cells*) underlying the installation of *resistance, genetic adaptation (by mutation genetics and selection, etc.)*.

**Subchapter 1.8.** presents the analysis of trends in the evolution of antibiotic resistance. Most reports refer to the increasing trend of the use of antimicrobials used in subtherapeutic

doses in rats and birds. So, antibiotics have reached our food but also our drinking water and over time the bacterial resistance increases. Fortunately, the routine use of antibiotics in animal feed is banned in the European Union.

**Subchapter 1.9.** treats *the environmental impact of the reckless use of anti-infectives*. The concentrations of antibiotics accumulated in the external environment will exert selective pressure on the bacteria in the environment and may favor the transfer of resistant genes, contributing to the creation of the "*resistome*", a mixture of genetic traits of resistance. One area of interest is the long-term effect of antibiotic residues in the environment

**Subchapter 1.10.** lists national and international antibiotic resistance programs. National or international agencies shall be responsible in particular for monitoring antimicrobial use and assessing rates of resistance to livestock, food and / or humans.

## Own research

This part extends over 84 pages (representing 67.2% of the thesis) is composed of four major chapters and the general conclusions chapter:

### Chapter 2. Study of the evolution of mortality in 49 farms in western Romania

#### *The objective of the study*

Mortality of pigs on commercial farms around the world is a significant loss that can not and will not be completely eliminated, but only reduced to some economically bearable values. The causes of these losses are dependent on factors that may vary depending on the management of the units, the health of individuals, accommodation and microclimate conditions. For this purpose, we made a comparison between the two types of farms encountered in the area studied on intensive swine breeding models in western Romania, where we assessed the costs of treatment and prevention and monitored livestock and rate mortality of pigs on farms.

#### *Place of study:*

The experiment took place over a calendar year, taking into account more than half a million pigs, from **49 breeding units** structured in two categories: high-capacity farms (type A) and low-capacity farms (type B). The units are located in the field part of the studied area: **35 units** in the southwest of Timiș County, **13 units** in the northwest of Arad County and **one unit** in the west of Caraș Severin County.

#### *Statistical analysis*

Data processing and statistical interpretation was performed using the IBM SPSS Statistics program (Version 2.1) and data were taken on the mortality rate in the units, recorded by each farmer for each production hall. Also in the same analysis were counted the value of treatments and vaccinations performed, as well as their impact on mortality in the units studied.

#### *Results*

The economic calculations of farmers holding pig farming units in the western area show that acceptable mortality must not exceed 5.5%, which is the maximum value allowed for pig farms to be profitable.



The statistical analysis on the evolution of mortality in the farms under study was around 4.44% so that economically, the farms meet the profitability scale.

Following our research, following batches of pigs from different farms, from weaning to slaughter (approximately 6 months), resulted in mortality rates of: 4.23% in type B farms, and 4, 51% in type A farms. The grouping of farms according to an economic analysis is essential nowadays, in order to highlight the budgetary impact of the treatments in relation to their efficiency. As in the case of the mortality assessment, we classified the farms according to the level of expenditure on medicines used in the prevention and treatment of pigs. Farms were classified into four groups, according to the level of expenditure and the amount of treatments applied:

- Group I included in the range: 0 - 6.26 pecuniary units / individual.
- Group II included in the range: 6.27 - 12.52 pecuniary units / individual.
- Group III included in the range: 12.53-18.79 pecuniary units / individual.
- Group IV included over the value: 18.80 pecuniary units / individual.

As can be seen, the first three groups can fall into the category of eligible expenditure which does not put much pressure on the investment budget provided for disease control and prevention actions in pig breeding units. Adult mortality was consistently higher compared to youth mortality, a fact reported by other authors. The increased incidence of mortality occurs mainly in older and economically valuable pigs and cannot be predicted.

In type A farms, at the date of the study, mortality varied significantly, implicitly the expenses with the treatment and prevention of diseases that varied from 6 pecuniary units / individual, to 11.9 pecuniary units / individual. In type B farms the maximum allowable mortality limit has not been exceeded, but it can be seen that in these units the costs of treatment per animal have been high. By correlating these data on the impact of treatments performed on the evolution of farm mortality, we obtained statistically significant data, and its value  $p \leq 0.01$ . This demonstrates that a correctly applied treatment is effective in maintaining a low mortality rate. These results confirm that in the case of pig farms in our study, a much more severe approach is needed to the biosecurity measures implemented in these farms in order to eliminate the sources that generate additional costs and, implicitly, to reduce the profit.

### **Chapter 3 - Study of antibiotic resistance in pig farms in western Romania**

#### ***Place of study***

Within this research, ten units with intensive growth system were selected, structured by age and weight categories, located in Timiș and Arad counties, where cases of colibacillary enteritis were examined.

#### ***Motivation of the study***

Digestive disorders in pigs caused by a number of commensal or pathogenic bacteria can cause symptoms with a major impact on growth spurts, meat quality, and thus a decrease in economic profit. Globally, these bacteria cause major losses on farms, of all pathogens, *E. coli*, is an important factor in the onset of enteric syndrome, causing significant material damage by decreased productivity, associated with increased production costs and low profitability.

### ***The objective***

In this experiment, aspects related to the isolation of *E. coli* strains and gender classification based on biochemical properties, evaluation of the sensitivity and resistance profile to various antimicrobial substances and statistical interpretation of the results through the Anova program (t-test).

### ***Establishing the diagnosis***

The definite diagnosis was based on the clinical signs highlighted by the veterinary medical staff in the units, corroborated with the morphopathological examination and laboratory examinations by identifying the pathogen performed in the disciplines of necropsy and infectious diseases at the Faculty of Veterinary Medicine in Timisoara.

### ***Isolation of the etiological agent***

Bacteriological analyses were performed on **167 biological samples** (portion of small intestine, liver, kidney, lung harvested from pigs). Samples were taken from the biological material with the help of the Pasteur pipette, which were later introduced into the bouillon, and from here, with the help of the Drigalsky loop, they were transferred to nutrient agar and poured into Petri dishes. From the examined samples: 75.44% = positive, 10.77% = haemolytic, 13.79% = negative.

### ***Method of testing and interpreting susceptibility***

For this study, only the non-haemolytic positive samples that were tested by the Kirby-Bauer disc-diffusimetric method were taken into account, having as operating principle the determination of the sensitivity or resistance of a bacterial culture to an antibiotic.

This method is performed in Petri dishes with solid media, where the bacterial culture will be sown. Antibiotic discs are applied to the surface of the medium so that a diffusion halo will be formed around them based on the local antibiotic concentration gradient.

After the formation of the well around the tablet with active substance, its diagonal is measured, and the result is compared with the interpretive table CLSI / 2009 (Clinical Laboratory Standard Institute USA, 2009). The results were divided into four categories as follows: sensitive (susceptible-S), moderate sensitive (*intermediate-I*), resistant (R), non-susceptible (NS).

### ***Statistical analysis***

The assessment of variance between groups was established using bidirectional ANOVA, for samples, with Tukey's multiple comparison test, given that the differences are provided statistically when  $p < 0.05$  or less. The software applied was Graph Pad Prism 6.0 for Windows. (GraphPad Software, San Diego, USA). Values were expressed as average  $\pm$  SEM (Standard Error Media).

### ***Results***

Antibiotic resistance is a major public health concern, as antibiotic-resistant pathogens from animals can also be pathogenic to humans. Their transmission can be easily accomplished through the food chain, or spread widely in the environment through animal waste. The evolution of the resistance phenomenon in the two counties (Timiș - **84 positive samples from 7 farms** and Arad - **42 positive samples from 3 farms**) of *E. coli* strains isolated from piglets, around weaning or post-weaning age, compared to the **11 antibiotics**

Percentage evolution of resistance / antibiotic in farms in the two **Timiș County**: Doxycycline (10%), Lincospectin (9%), Colistin (6%), Gentamicin (4%), Neomycin (13%),

Ciprofloxacin (3%), Enrofloxacin (5%), Amoxicillin / clavulanic acid (4%), Florfenicol (8%), Tetracycline (14%), Erythromycin (14%).

Percentage evolution of resistance / antibiotic in farms in the two **Arad County**: Doxycycline (14%), Lincospectin (15%), Colistin (5%), Gentamicin (3%), Neomycin (9%), Ciprofloxacin (2%), Enrofloxacin (4%), Amoxicillin / clavulanic acid (10%), Florfenicol (7%), Tetracycline (16%), Erythromycin (15%).

#### **Chapter 4. Correlation between antibiotic resistance and bacterial lipid composition in *Enterobacteriaceae***

##### ***Motivation of the study***

We aimed to make a correlation between antibiotic resistance and bacterial lipid composition based on the function and structure of the bi-lipid layer of the bacterial cell closely related to the passage of antimicrobials through membranes.

##### ***The objective***

This study aims to identify the pathogen using the API 20E multi-test system; establishing the level of resistance to the action of antimicrobial substances by disc-diffusimetric method and determination of fatty acids in the bacterial membrane by the method of identification of methyl esters using GC-MS apparatus.

##### ***Place of study***

The samples were collected in June 2016 from a pig breeding complex in Arad County, we took a number of 15 intestinal samples from pigs that were previously monitored and showed symptoms specific to colibacillary enteritis. Their examination and testing was performed using a multi-test biochemical system for the identification of microorganisms API 20E and by the disc-diffusimetric method in the laboratory of infectious diseases (FMVT). The analysis of fatty acids from the bacterial membrane was performed in the toxicology laboratory within the Emergency County University Clinical Hospital "Pius Brinzeu" Timișoara.

##### ***Methods used***

Identification of the pathogen was done using a multi-test biochemical system for the identification of microorganisms API 20E. The components of the system are made of plastic, the tray ensures the humidity necessary for testing, and the gallery on which the 20 compartments are located allows observation of colorimetric changes depending on the presence or absence of the pathogen. Compared to classical methods, the use of multi-test identification systems is faster and much more accurate / secure.

The analysis of fatty acids in the bacterial membrane was performed by gas chromatography which can detect compounds that can be vaporized, and then can detect concentrations in the order of ppm or ppb. The microorganisms, isolated and cultured on selective media in optimal conditions of temperature and humidity, were subjected to testing in order to highlight the fatty acids in the bacterial membrane. For these determinations, at least 4 preliminary operations (saponification, methylation, extraction, washing) with the same amount of reagents are required. The chromatographic analysis equipment used was a Varian Saturn 2000 GC / MS with a CP-3800 GC. These combined components create a platform like a versatile GC and a flexible MS system. Both components support a wide

range of highly productive and easy-to-use options. The electronic data is stored on the hard disk, and the composition of the fatty acid methyl ester of the sample is compared with a database stored using the Sherlock recognition software model where more than 100,000 analyses are stored.

### **Results**

The investigations being performed only on samples taken from swine treated with antibiotics and where the ineffectiveness of the treatments was confirmed, the present study tries to deepen the correlation between the acquired resistance and the composition in fatty acids present in the bacterial membrane of *E. coli* (which showed resistance to common antibiotics used in the treatment of pigs). Of the total samples tested, **11** were positive with varying susceptibility evolutions. The results of the identification of fatty acids extracted with methanol were studied using gas chromatography. Quantification of the results from the 11 chromatograms (collection quadrants) and highlighting of fatty acids from the bacterial membrane of *E. coli*, depending on the retention time, determined that the amount of fatty acids compared to the susceptibility rate of antibiotics used in this study was higher in the S phenotype compared to the R phenotype, a fact also discovered by other researchers, identifying significant differences in terms of quantity between the fatty acid composition of sensitive and resistant strains.

The most notable fact was that in the resistant strains we observed proportional decreases of acids compared to the sensitive strains of *E. coli*. Only in the sixth sample the presence of methyl- (Z) -11-tetradecenoate acid can be seen, and after evaluating the susceptibility by the diffusimetric disc method, this sample showed the lowest rate of antimicrobial resistance.

## **Chapter 5. Comparative evaluation of the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes on ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* in swine units and a hospital in western Romania**

### ***Motivation of the study***

Recently, the phenomenon of antibiotic resistance has grown, in such a way that doctors encounter difficulties in practice due to the decreasing effectiveness of antimicrobials and the increasing development of adaptation / defence mechanisms of microorganisms. The quinolone group has been used for prophylaxis against Gram-negative infections in both humans and animals, but the impact on the resistance mechanisms of this important group still requires further exploration. Current molecular genetic techniques can facilitate research to highlight genes that can help us decipher the ecological impact of the phenomenon of resistance on health. In these cases, the use of PCR (Polymerase Chain Reaction) methodology provides a simple, fast and accurate detection of antibiotic resistance profiles, becoming a regularly used method of diagnosis and surveillance of antibiotic resistance in epidemiological and ecological studies.

### ***The objective***

Because we were concerned about the resistance of the quinolone group that appeared in western Romania in humans and animals, this study attempts to identify cases resistant to CIP and has monitored *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* plasmids in samples of *E. coli*, from humans and pigs, using the molecular technique.

### ***Place of study***

The experiment took place between January 2019 and January 2020, in the western part of Romania (Timiș and Arad Counties), a well-developed area in terms of the livestock industry focused on raising pigs in an intensive system. For this study we opted for large swine breeding units where the casuistry is usually diverse, and the incidence of colibacillary diseases was increased. We were also interested in the staff working in these farms, the number of employees being proportional to the size of the units.

### ***Sampling***

The examination was performed on freshly harvested biological material from pigs, from the intestinal contents where pure cultures of *E. coli* were isolated. Samples from humans for laboratory processing were provided from a large hospital in Timisoara, the blood samples being collected in K3-EDTA blood collection vacutainer.

Examination of human samples was performed on biological material from pure *E. coli* culture taken in PBS (phosphate buffered saline) from culture plates.

### ***Methods used***

Identification of Bacterial sensitivity / resistance was tested using the standardized Kirby-Bauer disc diffusion technique for **21 antibiotics** commonly used in human medicine, as well as **15 antibiotics** (and combinations) commonly used in veterinary medicine on 147 isolated strains of *E. coli* taken from humans and 53 strains isolated from pigs. Interpretation of antibiotic resistance was performed by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Isolation of bacterial DNA was performed using the PureLink® Genomic DNA Minim Mini-Kit, according to the protocol described by the manufacturer. Analysis of the quality and quantification of bacterial DNA was performed using UV spectroscopy.

DNA purity, Optical Density (OD) was analysed at 260/280 on a nano-volume ScanDrop spectrophotometer (Analytik Jena, Jena, Germany), we took into account only samples with a DNA purity of about 1.8, values recorded below this level indicating contamination of the samples. DNA amplification was performed in PCR on a thermocycler (Biometra™, Analytik Jena, Jena, Germany) for 35 cycles, using FIREsol® Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) and specific primers for *qnrS*, *qnrA* and *qnrB* genes. Statistical analysis of the data was performed using the IBM SPSS Statistics function (Version 2.1.) and the Crosstabs function.

### ***Results***

The results of TSA isolated from pigs indicate the presence of multidrug-resistant strains from 53 samples analysed, **15 isolated** showed resistances to CIP, and in humans the **147 samples** also showed high levels of resistance to CIP, but proportionally lower compared with those from pigs.

For quality and quantification analysis of DNA extracted from bacterial cultures, only samples with a DNA purity of about 1.8 or higher was considered for PCR analysis. Consequently, of the **15 swine (S) samples** studied, only **12** represented appropriate genetic material, and in human (H) subjects, **15 DNA samples** from the total of **24 samples** taken from the culture medium.

The presence of the *qnrS* gene (417bp (bp= base pairs) was identified in **13** of the human subjects as well as in all swine cases studied. PCR amplification for the *qnrB* gene revealed its presence in **9** of the patients and in all cases of isolates obtained from pigs.

Regarding the *qnrA* gene, it was observed only in **3** of the isolates obtained from human subjects, but not in pigs. Thus, in cultures of *E. coli* isolated from human subjects *qnrS* was detected in 52% of cases, *qnrB* in 36% of cases and *qnrA* in 12% of cases. In pigs, *qnrS* and *qnrB* were reported in 100% of cases.

The present study indicates an increased prevalence of *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* resistance genes in quinolones in both human and swine subjects. A differentiation between the two situations is the presence of *qnrA* genes only in humans in proportion of 12%.

This leads to the hypothesis of direct or indirect contact of these subjects with low concentrations of ciprofloxacin, which may increase resistance through the presence of *qnrA* plasmid, a mechanism that is known to facilitate the survival of *E. coli* pathogens.

The last part of the thesis is dedicated to the ***Final Conclusions, guidelines for practitioners and revealing the aspects of originality / novelty*** in this thesis

- From our research the most important aspects of novelty are the observations:
- *Type B (low capacity) pig breeding units have a much lower mortality rate compared to type A (high capacity) units;*
- *The evolution of the resistance phenomenon is dependent on the location of the farms and the therapeutic management in the units;*
- *Methyl- (Z) -11-tetradecenoate acid was present only in the samples with the lowest identified rate of antimicrobial resistance phenomenon;*
- *The main qnrA gene (516 bp) was not found in pigs;*
- *The genes qnrA, (12%), qnrB (36%) and qnrS (52%) present in human samples and of qnrB and qnrS in pigs may facilitate the survival of pathogens under the action of quinolone group antimicrobials,*
- *Treatments with ciprofloxacin may facilitate the survival of pathogens, both in veterinary practice and in human therapeutic protocols. Thus, the hypothesis of transmitting resistance on the human-animal-human food chain is confirmed.*

