

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*Cercetări privind fenomenul rezistenței bacteriene la antibiotice în unități zootehnice din Vestul României*

### Prezenta teză conține:

Listă de abrevieri

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Stadiul actual al cunoașterii: 32 pagini

Cercetările proprii: 78 pagini

Tabele: 19

Figuri: 47

Grafice: 32

Surse bibliografice: 487

### I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Această parte se extinde pe 32 de pagini (29% din numărul paginilor tezei de doctorat) și este compusă dintr-un capitol care cuprinde șapte subcapitole, după cum urmează:

#### 1.1. Interferențe ale bacteriei *S. aureus* cu producția de lapte

În acest subcapitol se prezintă aspecte legate de producția de lapte din țara noastră, despre principalele rase de vaci utilizate în producția de lapte și despre consecințele economice și productive cauzate de mamita stafilococică, atât la nivelul țării noastre, cât și la nivel mondial. De asemenea, capitolul prezintă și o descriere a bacteriei *Staphylococcus aureus*, agent microbiologic cu prevalență ridicată în etiologia mamitei.

#### 1.2. Interferențe ale bacteriei *E. coli* cu producția de carne

În subcapitolul al doilea s-au detaliat aspecte privind producția și consumul de carne de porc la nivel mondial. În ceea ce privește producția de carne de porc, China produce aproape jumătatea din carnea de porc (46%). La nivel mondial, carnea de porc este cea mai consumată carne - în medie, anual, fiecare locuitor consumă 16 kg de carne de porc.

De asemenea, tot în acest subcapitol au fost abordate problemele legate de investițiile din sectorul creșterii porcilor pentru controlul și gestionarea virusurilor și bacteriilor implicate în epidemiologia bolilor cu impact economic major. Practicile actuale de biosecuritate sunt concepute în primul rând pentru a împiedica pătrunderea agenților patogeni - virusuri și bacterii - în efectiv, dar, cu toate acestea, nu se pot crea medii sterile și o mică greșeală, oricând posibilă, cauzează pierderea indemnității și apariția bolilor declarabile.

Ramura creșterii suinelor din vestul României se confruntă cu rezistența la preparate antimicrobiene (AMR), boli majore (pierderi uriașe din cauza Pestei porcine africane, precum și pierderile cauzate de bacterioze precum *Escherichia coli*); la cele menționate anterior se adaugă diminuarea indicilor de producție cum sunt sporul mediu zilnic (SMZ), consumul specific (CS) și pierderile prin creșterea mortalității.

### 1.3. Situația actuală a rezistenței la preparate antimicrobiene

În acest subcapitol a fost abordată problema răspândirii rezistenței la preparate antimicrobiene, fenomen care se află pe locul al 3-lea în Planul de acțiune al Comisiei Europene, estimându-se că în 2050 acest fenomen va fi responsabil pe Terra de 10 milioane decese. Un alt aspect îngrijorător este faptul că consumul de antimicrobiene la animalele de la care se obțin produse alimentare este mult mai mare decât la oameni, atât în termeni de consum total, cât și în termeni de doze administrate în raport cu masa lor metabolică. În fapt, o problemă majoră legată de controlul fenomenului AMR în medicina veterinară este și aceea că de aproape 40 de ani nu a mai fost descoperită și utilizată o clasă nouă de antibiotice.

### 1.4. Rezistența genetică la preparate antimicrobiene

Subcapitolul descrie modalitățile de transmitere a rezistenței genetice la preparatele antimicrobiene care se poate realiza în două moduri, și anume prin transfer vertical și transfer orizontal de gene de rezistență. Transferul vertical presupune ca informația genetică a bacteriei să fie transmisă la celulele fiice prin diviziunea celulară. Transferul orizontal al genelor se poate realiza: (1) prin absorbția ADN-ului liber din mediu (transformare), prin (2) transducția bacteriofagului și prin (3) contact direct între celulele bacteriene (conjugare). De asemenea, tot în acest subcapitol, sunt descrise și elementele genetice mobile (MGE) implicate în transferul genelor de rezistență, atât pentru *Staphylococcus aureus*, cât și pentru *Escherichia coli*.

### 1.5. Răspândirea rezistenței la antibiotice a *E. coli*

În acest subcapitol sunt descrise cauzele care au condus la utilizarea excesivă a antibioticelor: acestea sunt multifactoriale și includ diferite industrii, cum ar fi domeniul sănătății veterinare, ramuri zootehnice și industria farmaceutică. În același timp se cuvine menționat faptul că puține microorganisme au demonstrat capacitatea de a dezvolta rezistență la atâtea clase de antibiotice precum familia *Enterobacteriaceae*. Din lista mare de genuri bacteriene care aparțin acestei familii, *E. coli* este depășită doar de *Klebsiella* în numărul de infecții asociate bacteriilor multi-rezistente la medicamente. În acest subcapitol sunt descrise mecanismele de rezistență ale lui *E. coli* la antibiotice din diferite clase.

### 1.6. Răspândirea rezistenței la antibiotice la *Staphylococcus aureus*

Dezvoltarea rezistenței la antibiotice de către *S. aureus* a implicat, în principal, achiziționarea de elemente genetice mobile prin transferul orizontal al genelor, dar rezistența poate apărea și prin mutații care modifică situs-urile de legare al medicamentului pe țintele moleculare și prin creșterea expresiei pompelor de eflux endogene. În acest subcapitol sunt descrise mecanismele de rezistență ale lui *Staphylococcus aureus* la antibiotice  $\beta$ -lactam, meticilină, vancomicină, daptomicină, tetraciclină, aminoglicozide, linezolid, s.a..

### 1.7. Cut off-uri în aprecierea fenomenului AMR

În cadrul acestui subcapitol s-a încercat descrierea și exprimarea fenomenului AMR la nivelul mai multor paliere: microbiologic, genetic, clinic și farmacologic. Pentru stabilirea unor puncte de trunchiere microbiologice se folosesc metodele de difuzie pe disc și concentrațiile minime inhibitorii (MIC). Pentru depistarea genelor de rezistență la antibiotice sunt utilizate o serie de tehnici care includ PCR, PCR cantitativ sau în timp real (qPCR/RT-PCT), microarray ADN, secvențierea genomului (WGS) și metagenomica, ionizarea prin adsorbție laser asistată de o matrice (MALDI-TOF MS – acronim de la engl. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). Limitele categoriilor clinice sunt definite prin valori critice care, pentru speciile de interes veterinar, sunt grupate în: (1) valori limită epidemiologice, (2) valori critice clinice și (3) valori critice farmacocinetice / farmacodinamice.

## II. CERCETĂRI PROPRII

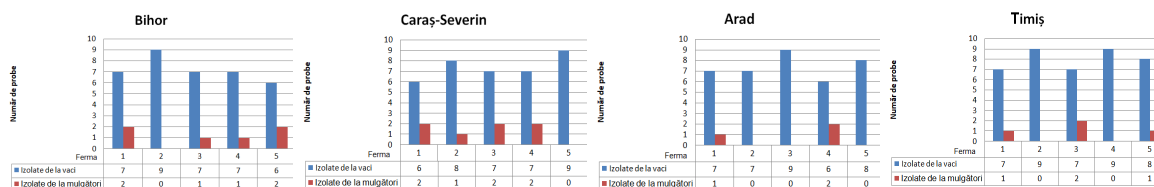
Partea a 2-a a tezei este desfășurată pe cuprinsul a 78 de pagini (71%) și este compusă din 4 capitole, după cum urmează.

### 2. Contribuții privind rezistența fenotipică la preparate antimicrobiene în izolatele de *Staphylococcus aureus*

**Scopul și obiectivele cercetării.** Scopul și obiectivele cercetărilor prezentate în acest capitolul au fost izolarea și caracterizarea fenotipică a rezistenței la preparate medicamentoase a tulpinilor de *S. aureus*. Cercetările s-au derulat având ca obiectiv înțelegerea amplitudinii problemei AMR în fermele de lapte din Vestul României. Pentru a conferi reprezentativitate studiului s-au caracterizat fenotipurile de rezistență la antibiotice din izolatele de *S. aureus* eșantionate printr-un studiu epidemiologic transversal în patru județe din Vestul țării. Probele au fost recoltate, atât de la animale, cât și de la angajații care intră frecvent în contact direct cu ugerul vacii (mulgători/îngrijitori).

**Materiale și metode.** Studiul s-a desfășurat în patru județe, Bihor, Arad, Timiș și Caraș-Severin, din regiunea de Vest a României, implicând 20 de ferme de vaci de lapte, stratificate în funcție de mărime lor. Studiu epidemiologic transversal a presupus o eșantionarea aleatorie stratificată (tragere la sorți) la nivelul fiecărui județ (5 ferme din fiecare județ), considerându-se dimensiunea fermei - s-a extras minimum o fermă pentru fiecare dintre cele patru clase de mărime (1-25, 26-50, 51-100 și peste 100 UVM/fermă) și minimum 5,86 animale/fermă, considerându-se relația  $n = \log \beta / \log p$  unde  $\beta$  este probabilitatea de a comite o eroare de tip II (în studiul de față s-a considerat o valoare  $\leq 0,05$ ) și  $p$  reprezintă proporția animalelor care nu sunt infectate (conform studiilor anterioare, s-a considerat o prevalență punctuală de 40%). Vacile supuse studiului au fost selectate inițial pe baza rezultatelor Buletinului oficial de analiză a laptelui din fermă (COP). Conform eșantionării, toate vacile care au înregistrat la controlul oficial anterior un număr de celule somatice mai mare de 200.000 celule/ml lapte au fost supuse unui screening cu *California Mastitis Test* (CMT). Au fost recoltate 325 de probe de lapte de la vacile detectate pozitiv la CMT. De asemenea, au fost prelevate 30 de probe de portanță de la angajații fermelor care au permis acest aspect (13 din 20 ferme - Figura 1). Prelevarea probelor s-a realizat cu ajutorul mediului de transport eSwab, pentru cultivare s-a utilizat Columbia Blood Agar. Ulterior, cu ajutorul sistemul *MicroScan Walk Away 40 SI*, s-a realizat confirmarea bacteriei și realizarea antibiogramei. Output-urile aparatului au fost centralizate și pe baza rezultatelor s-a calculat indicele de rezistență multiplă la antibiotice (MARI).

**Rezultate și discuții.** Din 325 de probe de lapte recoltate 46,15% au fost confirmate ca fiind *Staphylococcus aureus*, iar dintre probele de portanță prelevate de la mulgători, 66,66% au fost confirmate ca fiind *Staphylococcus aureus*. Antibioticele la care *S. aureus* a înregistrat cea mai mare **rezistență fenotipică** au fost: ampicilină (170/170), penicilină (170/170), clindamicină (120/170), cefalotin (88/170) și amoxicilină/acid clavulanic (86/170).



**Figura 1.** Numărul izolatelor animale și umane colectate din cele 20 de ferme eșantionate în patru județe din Vestul României (minimum 5,86 / probe / fermă)

O proporție mare (peste 80%) dintre izolate de *S. aureus* au prezentat **susceptibilitate fenotipică** la o varietate de preparate antimicrobiene, cum sunt: fosfomicina (150/170), ciprofloxacina (148/170), netilmicina (148/170), levofloxacina (156/170), gentamicina (142/170), moxifloxacina și trimetoprim / sulfametoxazol (138/170).

În cazul inoculărilor umane nu s-a înregistrat *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), dar, 20% dintre izolatele provenite de la vaci au fost identificate ca fiind MRSA. Rezistența și susceptibilitatea fenotipică a izolatelor de *S. aureus* au fost asociate cu sursa izolatului, caracterul MRSA, județul de origine, ferma de proveniență, dar nu cu dimensiunea fermei.

Indicele MAR a avut o valoare mare, **0,590±0,023**. În zona studiată, nici sursa izolatului (uman sau animal,  $t = 1,395$ ,  $p=0,092$ ), nici județul de origine ( $F=0,518$ , la  $p=0,671$ ) și nici UVM-ul fermei ( $F=0,042$ , la  $p=0,988$ ) nu au putut fi asociate statistic cu variațiile indicelui MAR, pe când caracterul MRSA ( $t = 8,010$ , la  $p<0,000$ ) și influențele fermei de proveniență (Testul Kruskal-Wallis,  $\chi^2=45,758$ , la  $p=0,001$ ) au părut să se asocieze cu indicele MAR.

### 3. Contribuții privind rezistența genetică la preparate antimicrobiene în izolatele de *Staphylococcus aureus*

**Scopul și obiectivele cercetării.** Scopul capitolului a fost cel de caracterizare a genelor de rezistență la preparate antimicrobiene a tulpinilor de *S. aureus*. Obiectivul este acela de a înțelege amploarea problemei AMR în fermele de lapte din Vestul României. Pentru aceasta s-au caracterizat genotipurile de rezistență la antibiotice din izolatele de *S. aureus* printr-un studiu epidemiologic transversal în patru județe din Vestul țării, în ferme de vaci de lapte. S-au analizat și evaluat asocierile genelor de rezistență selectate cu expresia fenotipică a susceptibilității și rezistenței cu scopul de a calcula penetranța, ca potențial indicator cu utilizare clinică.

**Materiale și metode.** După confirmarea speciei bacteriene de către MicroScan, din izolatele de *Staphylococcus aureus*, păstrate la  $-80^{\circ}\text{C}$ , s-a extras ADN cu ajutorul kit-ului *DNeasy Blood & Tissue*; cantitatea de ADN extrasă a fost cuantificată prin măsurarea concentrației de AND cu ajutorul Tecan-ului. Pentru depistarea genelor de rezistență s-a utilizat reacția qPCR cu echipamentul Agilent Technologies Stratagene Mx3005P. Genele supuse studiului au fost: *blaZ*, *cfr*, *ermB*, *ermC*, *mecA* și *tetK*.

Pentru determinarea rezistenței genotipice s-au calculat: penetranța, DOR și asocierea penetranței cu indicii fenotipici prin corelație și regresii cu indicele MAR.

**Rezultate și discuții.** Screening-ul pentru genele *blaZ*, *cfr*, *ermB*, *ermC*, *mecA* și *tetK* a evidențiat că 71,76% din izolate posedă genele studiate (G+). Practic, 77,4% din izolatele rezistente fenotipic (R), au și rezistență genotipică (RG+) și 64,93% din izolatele susceptibile fenotipic (S) posedă genele studiate (SG+). Studiul nu a putut susține o asociere între rezistența genetică (G+ pentru genele studiate) și sursa umană sau animală a probei eșantionului ( $\chi^2= 9,331$ , la  $p=0,097$ ) sau județul de origine ( $\chi^2=21,732$ , la  $p=0,115$ ), dar G+ a putut fi asociat cu ferma de proveniență ( $\chi^2=173,559$ , la  $p<0,000$ ) și dimensiunea fermei ( $\chi^2=26,516$ , la  $p=0,033$ ), în ceea ce privește UVM.

Calculul penetranței a înregistrat valori foarte mari: pentru gena *blaZ*, 74%; pentru *mecA*, 62%; pentru *ermC* și *cfr*, 53%; pentru *ermB*, 50%; și pentru *tetK*, 32%. În zona studiată, variațiile penetranței nu au putut fi asociate cu proveniența inoculatului, județul de origine sau mărimea fermei dar s-au evidențiat asocieri cu originea fermei și caracterul MRSA. Penetranța a fost calculată pentru fiecare dintre cele 170 izolate de *S. aureus*,  $\text{PEN}\% = \text{RG}^+ / (\text{RG}^+ + \text{SG}^+)$  considerând genele studiate. Pentru cele șase gene testate, eroarea medie și standard a PEN% a fost de  $0,361 \pm 0,020$ , mai mare în izolatele MRSA ( $0,667 \pm 0,046$ ) decât în izolatele non-MRSA ( $0,295 \pm 0,019$ ). În zona studiată, nici sursa inoculatului (uman sau animal,  $t=0,312$ ,  $p=0,755$ ), nici județul de origine ( $F=0,518$ , la  $p=0,671$ ) și nici UVM-ul fermei ( $F=0,043$ , la  $p=0,988$ ) nu au putut fi asociate cu variațiile PEN%, dar izolatele MRSA ( $t = 8,010$ , la  $p<0,000$ ) și ferma de proveniență au părut să se asocieze cu penetranța (Testul Kruskal-Wallis,  $\chi^2=45,279$ , la  $p=0,001$ ).

Valori predictive bune ale DOR (valori semnificative, supraunitare) s-au înregistrat în cazul genei *mecA* (pentru amoxicilină/acid clavulanic, cefoxitin și oxacilină), în cazul genei *cfr* (pentru cloramfenicol, linezolid, synercid și clindamicină), pentru gena *ermB* (claritromicină și eritromicină), pentru gena *ermC* (claritromicină, eritromicină și synercid) și pentru gena *tetK*, (tetraciclină).

Penetrația germenului *S. aureus* din aria studiată se corelează puternic pozitiv și semnificativ cu indicele MAR ( $r = + 0,878$  și  $p < 0,000$ ). Considerând costurile analizelor genomice (qPCR) și asumându-ne predicția variației, indicele MAR poate fi un predictor destul de bun pentru penetranță (PEN%) prin regresii, relații liniare (conform relației 3.1) sau pătratice (conform relației 3.2):

$$\text{PEN\%} = -0.115 + (0.806 \times \text{MAR}), (p < 0.000, R^2 = 0.772) \quad 3.1$$

$$\text{PEN\%} = 0.161 - (0.426 \times \text{MAR}) + 1,036 \times \text{MAR}^2, (p < 0.000, R^2 = 0.823) \quad 3.2$$

#### 4. Contribuții privind studiul fenomenului rezistenței fenotipice la preparatele antimicrobiene în izolatele de *Escherichia coli* prelevate de la porcei

**Scopul și obiectivele cercetării** au fost izolarea *E. coli* din fermele de creștere a suinelor din Vestul României și caracterizarea rezistenței fenotipice în cadrul unui eșantion reprezentativ. Obiectivul cercetării este acela de a înțelege amploarea problemei AMR în fermele de creștere a porceilor din două județe situate în Vestul României aflate sub aceleași condiții de biosecuritate, management și strategie terapeutică. Pentru a face acest lucru, s-au caracterizat fenotipurile de rezistență la antibiotice din izolatele de *E. coli* printr-un studiu epidemiologic retrospectiv sezonier.

**Materiale și metode.** Pentru acest studiu, dintr-un total de 15 ferme de tineret, s-au utilizat patru ferme din județele Arad și Timiș, alese aleatoriu și în baza unui acord de confidențialitate. După eșantionare, studiul a presupus recoltarea periodică de probe. Pentru studiul de față s-a considerat o prevalență punctuală de 50% care cadrează cu rezultatele preliminarilor efectuate în fermele supuse studiului. În conformitate cu relația  $n = \log \beta / \log$ , cu eroarea de tip II  $\leq 0,05$  și proporția animalelor care nu sunt infectate de 50%, numărul minim de probe recoltate a fost stabilit la 4,32 / fermă și sezon. Studiul s-a desfășurat pe o perioadă de un an și jumătate, timp în care s-au prelevat probe de fecale de la tineret suin la fiecare trei luni. În total s-au prelevat un număr de 140 de probe cu ajutorul sistemului de transport în mediu lichid eSwab. Pentru cultivarea probelor s-a utilizat *MacConkey Agar*, după care au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. Pe baza caracterelor culturale s-a identificat inițial *E. coli*, după care s-a repicat pe o nouă placă pentru a obține o cultură cât mai pură.

Cu ajutorul aparatului *MicroScan Walk Away 40 SI* s-a confirmat tulpina bacteriană și s-a realizat antibiograma pentru fiecare probă. Output-urile aparatului au fost centralizate și pe baza rezultatelor s-a calculat indicele de rezistență multiplă la antibiotice (MARI).

**Rezultate și discuții.** Din cele 140 de izolate presupuse de *E. coli*, 54,3% (n=76) au fost confirmate ca fiind *pozitive* pentru această bacterie.

Studiul nu susține existența unor diferențe semnificative între frecvența identificării germenului *E. coli* în diferite anotimpuri ( $\chi^2 = 1,151$ ,  $p = 0,765$ ) sau diferite ferme ( $\chi^2 = 2,072$ ,  $p = 0,558$ ) – putem asuma că problema semnalată este una universală și se perpetuează de mult timp. Ca urmare, studiul poate susține ipoteza că infecțiile sau portanța germenului *E. coli* nu depind de fermă sau sezon.

Studiul asupra tulpinilor de *E. coli* rezistente la antibiotice de la porcii cu diaree din fermele din vestul României a arătat niveluri ridicate de susceptibilitate și rezistență la unele antibiotice. Primele cinci antibiotice față de care *E. coli* manifestă **susceptibilitate** sunt următoarele: amikacin 100%, meropenem 100%, tigecilină 96,05%, fosfomicină 96,05%, piperacilină/tazobactam 89,47%. Nu toate antibioticele identificate și ierarhizate ca fiind eficiente pot fi utilizate în medicina veterinară. Dintre antibioticele față de care *E. coli* manifestă niveluri ridicate ale **rezistenței** menționăm următoarele: ampicilină 100%, mezlocilină 100%, moxifloxacină 100%, ciprofloxacină 100%, trimetoprim / sulfametoxazol 85,53%.

Valoarea indicelui MAR este mai mare decât dublul valorii acceptate în studiile de specialitate (media este de  $0,477 \pm 0,017$ , deviația standard este de 0,154). Factorii de variație considerați, respectiv ferma de proveniență a inoculatului (*Kruskal Wallis Test*,  $\chi^2 = 1,426$  la  $p = 0,699$ ) și sezonul prelevării probelor (*Kruskal Wallis Test*,  $\chi^2 = 1,149$  la  $p = 0,765$ ) nu s-au dovedit a fi asociabili valorilor medii ale indicelui MAR.

## 5. Contribuții privind caracterizarea moleculară a rezistenței antimicrobiene la izolatele de *E. coli* de la porcii din regiunea de Vest a României

**Scopul și obiectivele cercetării** au fost caracterizarea genelor de rezistență la preparate antimicrobiene a tulpinilor de *E. coli* din fermele de creștere a suinelor din Vestul României. Obiectivul este acela de a înțelege amploarea problemei AMR în fermele de tineret suin gestionate după aceleași strategii, tactici și măsuri operaționale specifice unei companii din Vestul României. Pentru aceasta s-au caracterizat genotipurile de rezistență la antibiotice din izolatele de *E. coli* printr-un studiu epidemiologic transversal în patru ferme din două județe din Vestul țării. S-au analizat și evaluat asocierea genelor de rezistență selectate cu expresia fenotipică a susceptibilității și rezistenței cu scopul de a calcula penetranța, ca potențial indicator cu utilizare clinică.

**Materiale și metode.** După confirmarea speciei bacteriene de către MicroScan, din izolatele de *E. coli*, păstrate la -80°C, s-a extras ADN cu ajutorul kit-ului *DNeasy Blood & Tissue*. Cantitatea de ADN extrasă a fost cuantificată prin măsurarea concentrației de ADN cu ajutorul Tecan-ului. Pentru depistarea genelor de rezistență s-a utilizat reacția qPCR cu echipamentul Agilent Technologies Stragene Mx3005P. Genele supuse studiului au fost: *ampC*, *blaZ*, *blaTEM* și *tetK*. Pentru determinarea rezistenței genotipice s-au calculat: penetranța, DOR și asocierea penetranței cu indicii fenotipici prin corelații și regresii cu indicii MAR.

**Rezultate și discuții.** Screening-ul pentru genele *ampC*, *blaZ*, *blaTEM* și *tetK* a evidențiat că 62,8% din izolate posedă amplificări pentru genele studiate (G+). Practic, 62,8% din izolatele rezistente fenotipic (R), au și rezistență genotipică (RG+) și 61,3% din izolatele susceptibile fenotipic (S) posedă genele studiate (SG+). Pentru genele studiate (*ampC*, *blaZ*, *blaTEM* și *tetK*), genotipurile care conferă rezistență la *E. coli* nu au putut fi asociate cu ferma de proveniență a izolatului ( $\chi^2=28.05$  la  $p=0.419$ ) sau sezonul prelevării probelor ( $\chi^2=110.12$  la  $p=0.708$ ).

Valori predictive bune ale DOR (valori semnificative, supraunitare) s-au înregistrat în cazul genei *tetK* (pentru tetraciclină și tigeciclină - DOR=2,11). Pentru genele *ampC*, *blaZ* și *blaTEM* măsurarea eficacității testului de diagnostic AST pentru rezistența fenotipică pozitivă (DOR) are valoare subunitară, ca urmare examenul microbiologic fenotipic trebuie asociat cu examenul genotipic pentru a identifica genotipurile sensibile, dar purtătoare de gene ale rezistenței la preparate antimicrobiene.

Pentru genele studiate, penetranța a înregistrat valori mari: *ampC* - 50% ; *blaZ* - 65%; *blaTEM* - 51%, *tetK* - 44%. Penetranța a fost calculată pentru fiecare dintre cele 76 de izolate de *E. coli*, ca  $PEN\% = RG^+ / (RG^+ + SG^+)$ , pentru cele patru gene testate, eroarea medie și standard a PEN% a fost de  $0,482 \pm 0,030$  (cu deviația standard 0,261). Ferma de origine a inoculatului (*Kruskal Wallis Test*,  $\chi^2=2,819$  la  $p=0,420$ ) și sezonul prelevării probelor (*Kruskal Wallis Test*,  $\chi^2=1,1380$ , la  $p=0,710$ ) considerați ca posibili factori de variație, nu s-au dovedit a fi asociabili valorilor medii ale PEN%. În ceea ce privește penetranța, este evident că cefotaxinul (P%=100%), ampicilina, (P%=99%) și tetraciclina (P%=83%) nu ar trebui să mai fie utilizate în fazele de creștere ale porcilor.

Penetranța germeului *E. coli* din fermele considerate se corelează puternic pozitiv și semnificativ cu indicele MAR ( $r = + 0,806$  la  $p < 0,000$ ). Considerând costurile analizelor genomice (qPCR) și asumându-ne predicția variației, indicele MAR poate fi considerat ca variabilă de predicție pentru PEN%, conform unor regresii liniare (relația 5.1) sau pătratice (relația 5.2), cum sunt cele de mai jos:

$$PEN\% = -0.171 + (1,367 \times MAR), (p < 0.000, R^2 = 0.650) \quad 5.1$$

$$PEN\% = 0.085 + 0,273 \times MAR + 0,060 \times MAR^2, (p < 0.000, R^2 = 0.657) \quad 5.2$$

## 6. Concluzii generale și recomandări

### 6.1. Concluzii generale

- Amploarea fenomenului rezistenței la preparate antimicrobiene depășește limitele maxim admise în ambele ramuri de producție, la ambele specii, pentru majoritatea antibioticelor de uz veterinar. Atât în cazul germenului Gram pozitiv (*S. aureus*) cât și în cazul celui Gram negativ (*E. coli*) valorile înregistrate în studiu sunt cel puțin duble față de valoarea prag a *indicii de rezistență multiplă* ( $MAR < 0,2$ ).
- În relație cu eficiența sau ineficiența utilizării preparatelor antimicrobiene indicatorul *Penetranță (%)* este preferabil *indicii de rezistență multiplă, MAR (%)* deoarece consideră și rezistența genetică. Dezavantajul constă în costul obținerii datelor pentru calculul penetranței.
- Măsurarea eficacității testului de diagnostic (AST) pentru rezistența fenotipică pozitivă (indicatorul DOR) trebuie considerată la nivel de ramură de producție, germen, genă de rezistență și preparat antimicrobian deoarece doar astfel este posibilă cuantificarea cazurilor susceptibile fenotipic, dar rezistente genetic.
- Asocierea genotipului cu fenotipul în termenii frecvenței (*R+*, *R-*, *G+*, *G-*) prin DOR poate fi îmbunătățită prin corelația și regresia dintre fenotip și genotip, prin considerarea variabilelor categoriale *MARI* și *PEN%* - această juxtaponere permite obținerea unor estimări rapide, cu costuri reduse, solicitând doar o prelucrare superioară a informațiilor.
- Corelația și regresii rezistenței multiple la antibiotice (*MAR*) cu penetranța (*PEN%*) sugerează legătura dintre acești indici și rolul estimativ al unuia asupra celuilalt.

### 6.2. Recomandări

În pofida faptului că utilizarea și suprautilizarea antibioticelor poate crește supraviețuirea animalelor, aceasta conduce la creșterea și selecția rezistenței la antibiotice. Așa cum se poate observa în cazul fermelor supuse studiului de față, uneori prezența AMR poate reduce sau chiar anula eficacitatea antibioticelor pentru diferiți germeni sau categorii de animale.

Ca urmare, pentru gestionarea AMR se recomandă realizarea de strategii/tactici/planuri de măsuri operaționale, cu următoarele puncte succesive:

1) *Prelevarea periodică a probelor microbiologice* pentru tipizarea/identificarea agentului etiologic al bolilor cu impact economic;

2) Realizarea strategiilor, tacticilor și *programelor de tratament în concordanță cu rezultatele antibiogramelor*;

3) Concasarea și procesarea informațiilor obținute prin microbiologia clasică la realizarea antibiogramelor la nivel de specie, fermă, areal geografic și *calcularea indicelui de rezistență multiplă* la preparate antimicrobiene (*MAR*) pentru fiecare unitate considerată (ramură, fermă, categorie de animale, germen - uneori mediile ascund deficiențe serioase):

a. Dacă valoarea acestui indice este  $MAR < 0,2$  se recomandă continuarea periodică a screening-ului, dependent de rezultatele tratamentelor din fermă.

b. Dacă valoarea acestui indice este  $MAR \geq 0,2$  se recomandă i) *anchetă epidemiologică* pentru a decela posibilele cauze (contaminare, suprautilizare, nerespectarea posologiei etc.) și ii) *aprofundarea AMR prin analize genetice* atât pentru genele asociabile antibioticelor uzate cât și pentru cele care nu au fost utilizate în fermă/sector/ramură.

4) Concasarea și procesarea informațiilor obținute prin analiza genotipului bacterian pentru măsurarea eficacității testului de diagnostic AST pentru rezistența fenotipică pozitivă (DOR):

a. Dacă valoarea DOR  $\geq 1,0$  testul de diagnostic AST este eficient și utilizabil pentru detectarea izolatelor cu rezistență genetică.

b. Dacă valoarea DOR < 1,0 pe lângă testul de diagnostic AST se impune continuarea testelor genetice (aspect semnalat mai ales la suine).

5) Stabilirea interacțiunii genotip bacterian - mediu terapeutic (norma de reacție bacteriană) prin cuantificarea legăturii (corelație, regresie) dintre penetranță (PEN%) și indicii de rezistență multiplă (MAR) cu scopul susținerii deciziei privind *i) continuarea utilizării*, *ii) restricția utilizării* sau *iii) eliminarea* unui preparat antimicrobian din programul de tratament pe motiv de AMR/ineficiență terapeutică. În cazul în care penetranța are valori mai mari de 0,20 se recomandă retragerea antibioticului din planul de intervenție terapeutică, din cauza riscului de a utiliza antibiotice în infecții cu micro-organismе susceptibile fenotipic, dar cu genele de rezistență.

***Ca urmare, pentru gestionarea fenomenului AMR se recomandă utilizarea unor indicatori de tipul MAR, penetranță (P%) și eficacitatea testului de diagnosticare a rezistenței fenotipice pozitive (DOR); acești indicatori pot direcționa strategia pentru dezvoltarea unui program de utilizare a antibioticelor. Totuși, sunt necesare mai multe studii privind stabilirea punctelor de trunchiere ale penetranței (cut-off genetic).***

## 7. Elemente de originalitate

Elementele de originalitate în prezenta teză de doctorat se referă la aspectele unice și inovative care diferențiază cercetarea de alte lucrări existente în domeniul rezistenței antimicrobiene; elementele de originalitate avansate includ:

- **Abordare interdisciplinară:** pentru a înțelege și combate răspândirea rezistenței antimicrobiene, studiul a presupus integrarea unor abordări din microbiologie, biologie moleculară, tehnologii de creștere, epidemiologie și biostatistică;
- **Utilizarea unor date originale:** datele colectate dintr-un areal destul de vast sunt reprezentative atât din perspectiva numărului de unități microbiologice alese, cât și a extragerii acestora.
- **Abordare inovativă:** studiul a presupus coroborarea abordărilor fenotipice specifice microbiologiei clasice (cultura bacteriană, antibiograma) cu abordarea genotipică specifică geneticii moleculare (identificarea genelor de rezistență AMR); rezultatele celor două abordări au fost juxtapuse prin metode epidemiologice (DOR, prevalență, penetranță) și biostatistice (corelații și regresii fenotip / genotip). Pentru realizarea asocierilor dintre genotip și fenotip s-au considerat atât frecvența manifestării unui fenomen (DOR, P%) cât și valoarea acestei manifestări (medii PEN%, MAR%).
- **Contribuția la cunoaștere:** introducerea regresii liniare sau pătratice pentru a măsura intensitatea legăturilor dintre fenotip și genotip este un model nou (ieftin, ușor aplicabil), care completează abordarea actuală (bazată pe DOR) care în cazul valorilor subunitare are nevoie de susținerea geneticii moleculare (model scump, care solicită timp și resurse materiale importante).
- **Aplicabilitate practică:** urmărirea pașilor recomandați (capitolul 6.2) permite dezvoltarea unor soluții practice și inovative privind utilizarea/restricționarea sau eliminarea din programele terapeutice a preparatelor antimicrobiene – abordarea are potențial de aplicare în industria creșterii porcilor, ramura exploatării vacilor de lapte și / sau în societate.

***Prin evidențierea acestor elemente de originalitate, teza de doctorat demonstrează valoarea sa și contribuția semnificativă pe care o poate aduce în domeniul de cercetare – medicină veterinară.***



## SUMMARY OF THE PHD THESIS

### Research on the antimicrobial resistance phenomenon in livestock units in Western Romania

**This thesis contains:**

*List of abbreviations*

*Summaries in Romanian and English*

*Introduction*

*Current state of knowledge: 32 pages*

*Own research: 78 pages*

*Tables: 19*

*Figures: 47*

*Graphics: 32*

*Bibliographic sources: 487*

#### I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This section extends over 32 pages (29% of the total pages of the PhD thesis) and is composed of one chapter containing seven subchapters as follows:

##### 1.1. Interferences of *S. aureus* bacteria with milk production

This subchapter presents aspects related to milk production in our country, the main breeds of cows used in milk production, and the economic and productive consequences caused by staphylococcal mastitis both nationally and globally. It also provides a description of the *Staphylococcus aureus* bacteria.

##### 1.2. Interferences of *E. coli* bacteria with meat production

The second subchapter details aspects regarding pork production and consumption worldwide. China produces almost half of the world's pork (46%). Pork is the most consumed meat globally, with each person consuming an average of 16 kg per year.

This subchapter also addresses issues related to investments in the pig farming sector for controlling and managing viruses and bacteria involved in the epidemiology of economically significant diseases. Current biosecurity practices aim primarily to prevent the entry of pathogens - viruses and bacteria - into the herd, but sterile environments cannot be created, and a small mistake can cause the loss of indemnity and the occurrence of reportable diseases. The pig farming sector in Western Romania faces antimicrobial resistance (AMR), major diseases (huge losses due to African Swine Fever and bacterial diseases like *Escherichia coli*), and diminished production indices like daily average gain (ADG), specific consumption (SC), and increased mortality losses.

### **1.3. Current situation of antimicrobial resistance**

This subchapter addresses the spread of antimicrobial resistance, which is the third item on the European Commission's Action Plan. By 2050, it is estimated that this phenomenon will be responsible for 10 million deaths globally. Another worrying aspect is that antimicrobial consumption in food-producing animals is much higher than in humans, both in total consumption and in doses administered relative to their weight. A major issue in controlling AMR in veterinary medicine is that no new class of antibiotics has been discovered and used in nearly 40 years.

### **1.4. Genetic resistance to antimicrobial preparations**

This chapter describes the ways in which genetic resistance to antimicrobial preparations can be transmitted through vertical and horizontal gene transfer. Vertical transfer involves the transmission of the bacterium's genetic information to daughter cells through cell division. Horizontal gene transfer can occur via: (1) absorption of free DNA from the environment (transformation), (2) bacteriophage transduction, and (3) direct contact between bacterial cells (conjugation). This subchapter also describes mobile genetic elements (MGEs) involved in the transfer of resistance genes for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

### **1.5. Spread of antibiotic resistance in *E. coli***

This subchapter describes the causes that led to the excessive use of antibiotics, which are multifactorial and include various industries such as veterinary health, livestock, and pharmaceuticals. Few microorganisms have demonstrated the ability to develop resistance to as many classes of antibiotics as the *Enterobacteriaceae* family. From the large list of bacterial genera in this family, *E. coli* is surpassed only by *Klebsiella* in the number of infections associated with multi-drug resistant bacteria. The mechanisms of *E. coli* resistance to different classes of antibiotics are described in this subchapter.

### **1.6. Spread of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus***

The development of antibiotic resistance in *S. aureus* primarily involves acquiring mobile genetic elements through horizontal gene transfer, but resistance can also arise through mutations that alter drug binding sites on molecular targets and by increasing the expression of endogenous efflux pumps. This subchapter describes the resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus* to various antibiotics, including  $\beta$ -lactams, methicillin, vancomycin, daptomycin, tetracycline, aminoglycosides, and linezolid.

### **1.7. Cut-offs in Evaluating the AMR Phenomenon**

This subchapter attempts to describe and express the AMR phenomenon at multiple levels: microbiological, genetic, clinical, and pharmacological. Methods such as disc diffusion and minimum inhibitory concentrations (MICs) are used to establish microbiological cut-off points. Techniques like PCR, quantitative or real-time PCR (qPCR/RT-PCR), DNA microarray, genome sequencing (WGS), and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) are used to detect antibiotic resistance genes. Clinical category limits are defined by critical values, which are grouped into: (1) epidemiological cut-off values, (2) clinical critical values, and (3) pharmacokinetic/pharmacodynamic critical values for veterinary species of interest.

## II. OWN RESEARCH

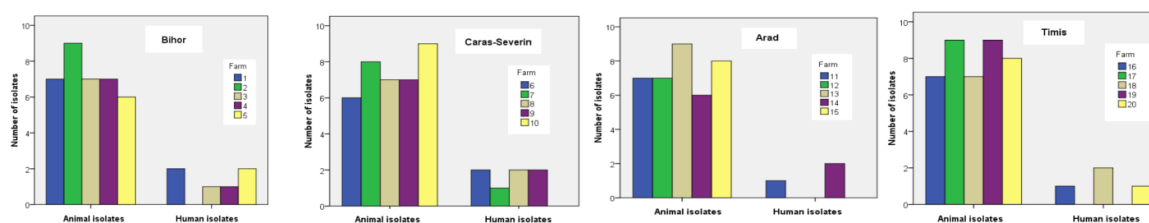
The second part of the thesis extends over 78 pages (71%) and consists of 4 chapters as follows:

### 2. Contributions to the phenotypic resistance to antimicrobial preparations in *Staphylococcus aureus* isolates

**Aim and objectives of the research.** The aim and objectives of the research presented in this chapter were the isolation and phenotypic characterization of drug resistance in *S. aureus* strains. The research aimed to understand the extent of the AMR problem in dairy farms in Western Romania. To give the study representativeness, phenotypic resistance to antibiotics in *S. aureus* isolates sampled through a cross-sectional epidemiological study in four counties in Western Romania was characterized. Samples were collected from both animals and employees who frequently come into direct contact with cows' udders (milkers/caretakers).

**Materials and methods.** The study was conducted in four counties (Bihor, Arad, Timiș, and Caraș-Severin) in the Western region of Romania, involving 20 dairy farms stratified by size. The transversal epidemiological study employed a stratified random sampling method at the county level, selecting five farms per county. The selection process accounted for farm size, ensuring at least one farm from each of the four size classes (1-25, 26-50, 51-100, and over 100 UVM/farm) was included. A minimum of 5.86 animals per farm were sampled, using the formula  $n = \log \beta / \log p$ , where  $\beta$  is the probability of committing a type II error (set at  $\leq 0.05$  for this study) and  $p$  represents the proportion of uninfected animals. Based on previous studies, a point prevalence of 40% was assumed for  $p$  value. Cows subjected to the study were initially selected based on the results of the farm's official milk analysis report. All cows that had a somatic cell count higher than 200,000 cells/ml in the previous official control were screened using the California Mastitis Test (CMT). 325 milk samples were collected from cows that were tested positive for CMT. Additionally, 30 samples were collected from farm employees who permitted this aspect (13 out of 20 farms - Figure 1). Sample collection was performed using the eSwab transport medium, and Columbia Blood Agar was used for cultivation. Confirmation of the bacterium and antibiotic susceptibility testing was performed using the MicroScan Walk Away 40 SI system. The system outputs were centralized, and based on the results, the multiple antibiotic resistance index (MARI) was calculated.

**Results and discussions.** Out of 325 milk samples, 46.15% were confirmed to be *Staphylococcus aureus*, while 66.66% of samples from milkers were confirmed as *Staphylococcus aureus*. The antibiotics to which *S. aureus* showed the highest phenotypic resistance were: ampicillin (170/170), penicillin (170/170), clindamycin (120/170), cephalothin (88/170), and amoxicillin/clavulanic acid (86/170).



**Figure 1.** Number of animal and human isolates collected from 20 sampled farms in four counties in Western Romania (minimum isolates,  $n = 5.86$  animals / extraction).

A large proportion (over 80%) of *S. aureus* isolates showed phenotypic sensitivity to a variety of antimicrobial preparations, including: fosfomicin (150/170), ciprofloxacin (148/170), netilmicin (148/170), levofloxacin (156/170), gentamicin (142/170), moxifloxacin, and sulfamethoxazole/trimethoprim (138/170). No methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was found in human inoculates, but 20% of isolates from cows were identified as MRSA.

The phenotypic resistance and sensitivity of *S. aureus* isolates were associated with the source of the isolate, the MRSA character, the county of origin, the farm of origin, but not with the farm size. The MAR index had a high value of  $0.590 \pm 0.023$ . In the studied area, neither the source of the isolate (human or animal  $t = 1.395$   $p=0.092$ ) nor the county of origin ( $F=0.518$   $p=0.671$ ) and the farm's LU ( $F=0.042$   $p=0.988$ ) could be statistically associated with MAR index variations, whereas the MRSA character ( $t = 8.010$   $p<0.000$ ) and farm influence (Kruskal-Wallis Test  $\chi^2=45.758$   $p=0.001$ ) seemed to be associated with the MAR index.

### 3. Contributions to the genetic resistance to antimicrobial preparations in *Staphylococcus aureus* isolates

**Aim and objectives of the research.** The aim of this chapter was to characterize the resistance genes to antimicrobial preparations in *S. aureus* strains. The objective was to understand the extent of the AMR problem in dairy farms in Western Romania. The resistance genotypes of *S. aureus* isolates were characterized through a cross-sectional epidemiological study in four counties in Western Romania in dairy farms. The associations between selected resistance genes and the phenotypic expression of susceptibility and resistance were analyzed and evaluated to calculate penetrance as a potential clinical indicator.

**Materials and methods.** After bacterial species confirmation by MicroScan, DNA was extracted from *Staphylococcus aureus* isolates stored at  $-80^\circ\text{C}$  using the DNeasy Blood & Tissue kit. The DNA quantity was quantified by measuring DNA concentration with Tecan. For detecting resistance genes, qPCR was used with Agilent Technologies Stragene Mx3005P equipment. The studied genes were: *blaZ*, *cfr*, *ermB*, *ermC*, *mecA*, and *tetK*.

**Results and discussions.** Screening for *blaZ*, *cfr*, *ermB*, *ermC*, *mecA*, and *tetK* genes revealed that 71.76% of isolates possess the studied genes (G+). Practically, 77.4% of phenotypically resistant isolates (R) also had genotypic resistance (RG+), and 64.93% of phenotypically sensitive isolates (S) possessed the studied genes (SG+). The study could not support an association between genetic resistance (G+ for the studied genes) and the human or animal source of the sample ( $\chi^2= 9.331$   $p=0.097$ ) or county of origin ( $\chi^2=21.732$   $p=0.115$ ), but G+ could be associated with the farm of origin ( $\chi^2=173.559$   $p<0.000$ ) and farm size ( $\chi^2=26.516$   $p=0.033$ ) regarding LU.

The penetrance calculation recorded very high values: for *blaZ* gene 74%; for *mecA* 62%; for *ermC* and *cfr* 53%; for *ermB* 5%; and for *tetK* 32%. In the studied area, penetrance variations could not be associated with the inoculate's origin, county of origin, or farm size, but associations with farm origin and MRSA character were highlighted. Penetrance was calculated for each of the 170 *S. aureus* isolates as  $\text{PEN\%} = \text{RG+}/(\text{RG+} + \text{SG+})$ , considering the studied genes. For the six tested genes, the mean and standard error of PEN% was  $0.361 \pm 0.020$ , higher in MRSA isolates ( $0.667 \pm 0.046$ ) than in non-MRSA isolates ( $0.295 \pm 0.019$ ). Neither the source of the inoculate (human or animal  $t=0.312$   $p=0.755$ ), the county of origin ( $F=0.518$   $p=0.671$ ), nor the farm's LU units ( $F=0.043$   $p=0.988$ ) could be associated with PEN% variations, but MRSA character ( $t = 8.010$   $p<0.000$ ) and farm origin appeared to be associated with penetrance (Kruskal-Wallis Test  $\chi^2=45.279$   $p=0.001$ ).

Good predictive values of DOR (significantly supraunitary values) were recorded for the *mecA* gene (for amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, and oxacillin), *cfr* gene (for chloramphenicol, linezolid, synergid, and clindamycin), *ermB* gene (for clarithromycin and erythromycin), *ermC* gene (for clarithromycin, erythromycin, and synergid), and *tetK* gene (for tetracycline).

Penetrance of *S. aureus* in the studied area strongly positively correlates and is significantly associated with the MAR index ( $r = + 0.878$  and  $p < 0.000$ ). Considering genomic analysis costs (qPCR) and assuming variation prediction, the MAR index can be a good predictor for penetrance (PEN%) through linear (3.1) or quadratic regressions (3.2):

$$\text{PEN\%} = -0.115 + (0.806 \times \text{MAR}) \quad (p < 0.000, R^2 = 0.772) \quad 3.1$$

$$\text{PEN\%} = 0.161 - (0.426 \times \text{MAR}) + 1036 \times \text{MAR}^2 \quad (p < 0.000, R^2 = 0.823) \quad 3.2$$

#### 4. Contributions to the study of phenotypic resistance to antimicrobial preparations in *Escherichia coli* isolates collected from piglets

**Aim and objectives of the research.** The aim and objectives of this study are to isolate *E. coli* from pig farming units in Western Romania and to characterize phenotypic resistance within a representative sample. The objective is to understand the extent of the AMR problem in piglet farming units in two counties in Western Romania under the same epidemiological/biosecurity conditions, management, and therapeutic strategy. For this purpose, phenotypic resistance to antibiotics in *E. coli* isolates was characterized through a retrospective seasonal epidemiological study.

**Materials and methods.** From a total of 15 youth farms, four farms from Arad and Timiș counties were randomly selected and based on a confidentiality agreement. The study was conducted over a year and a half, during which fecal samples were collected from piglets every three months. For the present study, a point prevalence of 50% was considered, which aligns with preliminary results conducted in the farms under study. According to the formula  $n = \log \beta / \log$ , with a type II error  $\leq 0.05$  and the proportion of uninfected animals at 50%, the minimum number of samples collected was established at 4.32 per farm per season. A total of 140 samples were collected using the eSwab transport system in liquid medium. Mac Conkey Agar was used for cultivation, and samples were incubated at 37°C for 24 hours. Based on cultural characteristics, *E. coli* was initially identified, then replated for a pure culture.

Using the MicroScan Walk Away 40 SI device, bacterial strain confirmation and antibiotic susceptibility testing were performed for each sample. The device's outputs were centralized, and the multiple antibiotic resistance index (MARI) was calculated based on the results.

**Results and discussions.** Out of 140 presumed *E. coli* isolates, 54.3% (n=76) were confirmed as positive for this bacterium. The study does not support the existence of significant differences between the frequency of identifying the *E. coli* germ in different seasons ( $\chi^2= 1.151$ , at  $p = 0.765$ ) or different farms ( $\chi^2= 2.072$ , at  $p = 0.558$ ) - we can assume that the reported problem is universal and perpetuates over time. Therefore, the study can support the hypothesis that infections or carriage of the *E. coli* germ do not depend on the farm or season.

The study of antibiotic resistant *E. coli* strains from pigs with diarrhea in Western Romanian farms showed high levels of sensitivity and resistance to certain antibiotics. The top five antibiotics to which *E. coli* shows sensitivity are: amikacin 100%, meropenem 100%, tigecycline 96.05%, fosfomycin 96.05%, piperacillin/tazobactam 89.47%. Not all identified and ranked effective antibiotics can be used in veterinary medicine. Among the antibiotics to which *E. coli* shows high levels of resistance, we mention: ampicillin 100%, mezlocillin 100%, moxifloxacin 100%, ciprofloxacin 100%, trimethoprim/sulfamethoxazole 85.53%.

The MAR index value is more than double the reported value in specialized studies (average is  $0.477 \pm 0.017$ , standard deviation is 0.154) but could not be associated with the farm or season of sampling. The considered variation factors, namely the farm of origin of the inoculate (Kruskal Wallis Test  $\chi^2=14.26$ , at  $p=0.699$ ) and the season of sample collection (Kruskal Wallis Test  $\chi^2=11.49$ , at  $p=0.765$ ), were not found to be associable with average MAR index values.

#### 5. Contributions to the molecular characterization of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from piglets in Western Romania

**Aim and objectives of the research.** The aim of this chapter was to characterize the resistance genes to antimicrobial preparations in *E. coli* strains from pig farming units in Western Romania. The objective is to understand the extent of the AMR problem in youth pig farming units managed according to the same strategies, tactics, and operational measures specific to a company in Western Romania. For this purpose, resistance genotypes of *E. coli* isolates were characterized through a cross-sectional epidemiological study in four farms in two counties in Western Romania. The associations between selected resistance genes and the phenotypic expression of susceptibility and resistance were analyzed and evaluated to calculate penetrance as a potential clinical indicator.

**Materials and methods.** After bacterial species confirmation by MicroScan, DNA was extracted from *E. coli* isolates stored at -80°C using the DNeasy Blood & Tissue kit. The DNA quantity was quantified by measuring DNA concentration with Tecan. For detecting resistance genes, qPCR was used with Agilent Technologies Stratagene Mx3005P equipment. The studied genes were: *ampC*, *blaZ*, *blaTEM*, and *tetK*.

**Results and discussions.** Screening for *ampC*, *blaZ*, *blaTEM*, and *tetK* genes revealed that 62.8% of isolates possess amplifications for the studied genes (G+). Practically, 62.8% of phenotypically resistant isolates (R) also had genotypic resistance (RG+), and 61.3% of phenotypically sensitive isolates (S) possessed the studied genes (SG+). The resistance genotypes that confer resistance to *E. coli* for the studied genes (*ampC*, *blaZ*, *blaTEM*, and *tetK*) could not be associated with the farm of origin of the isolate ( $\chi^2=28.05$  at  $p=0.419$ ) or the season of sample collection ( $\chi^2=110.12$  at  $p=0.708$ ).

Good predictive values of DOR (significantly supraunitary values) were recorded for the *tetK* gene (for tetracycline and tigecycline - DOR=2.11). For the *ampC*, *blaZ*, and *blaTEM* genes, the effectiveness of the AST test for positive phenotypic resistance (DOR) has a subunitary value; therefore, phenotypic microbiological examination must be associated with genotypic examination to identify sensitive genotypes but carrying resistance genes to antimicrobial preparations.

For the studied genes, penetrance recorded high values: *ampC* -50%; *blaZ* - 65%; *blaTEM* - 51%; *tetK* - 44%. Penetrance was calculated for each of the 76 *E. coli* isolates as  $PEN\% = RG+/(RG+ + SG+)$  for the four tested genes. The mean and standard error of PEN% was  $0.482 \pm 0.030$  (with a standard deviation of 0.261). The farm of origin of the inoculate (Kruskal Wallis Test  $\chi^2=28.19$  at  $p=0.420$ ) and the season of sample collection (Kruskal Wallis Test  $\chi^2=113.80$  at  $p=0.710$ ) considered as possible variation factors were not found to be associable with average PEN% values. Regarding penetrance, it is evident that cefotaxime (P%=100%), ampicillin (P%=99%), and tetracycline (P%=83%) should no longer be used in pig growth phases.

Penetrance of *E. coli* from the considered farms strongly positively correlates and is significantly associated with the MAR index ( $r = + 0.806$  at  $p < 0.000$ ). Considering genomic analysis costs (qPCR) and assuming variation prediction, the MAR index can be considered as a prediction variable for PEN% through linear (5.1) or quadratic regressions (5.2):

$$PEN\% = -0.171 + (1.367 \times MAR) \quad (p < 0.000 \quad R^2 = 0.650) \quad 5.1$$

$$PEN\% = 0.085 + 0.273 \times MAR + 0.060 \times MAR^2 \quad (p < 0.000 \quad R^2 = 0.657) \quad 5.2$$

## 6. General Conclusions and Recommendations

### 6.1. General Conclusions

- The extent of antimicrobial resistance (AMR) exceeds maximum permissible limits in both production branches for both species for most veterinary antibiotics. Both for the Gram-positive germ (*S. aureus*) and the Gram-negative one (*E. coli*), the values recorded in the study are at least double the threshold value of the multiple resistance index (MAR < 0.2).
- In relation to the effectiveness or ineffectiveness of antimicrobial preparations, the Penetrance indicator (%) is preferable to the multiple resistance index MAR (%) because it also considers genetic resistance. The disadvantage lies in the cost of obtaining data for calculating penetrance.
- The effectiveness of the AST diagnostic test for positive phenotypic resistance (DOR indicator) should be considered at the production branch, germ, resistance gene, and antimicrobial preparation level because only in this way is it possible to quantify phenotypically sensitive but genetically resistant cases.
- The genotype-phenotype association in terms of frequency (R+ R- G+ G-) through DOR can be improved by correlation and regression between phenotype and genotype considering categorical variables MARI and PEN% - this juxtaposition allows rapid estimates at low cost, requiring only higher-level information processing.
- Correlation and regressions of multiple antibiotic resistance (MAR) with penetrance (PEN%) suggest the link between these indices and the role of one as an estimate of the other.

## 6.2. Recommendations

Despite the fact that the use and overuse of antibiotics can increase animal survival, this leads to the increase and selection of antibiotic resistance. As can be seen in the farms subject to this study, sometimes the presence of AMR can reduce or even cancel the effectiveness of antibiotics for different germs or animal categories.

Therefore, for managing AMR, the following sequential points are recommended for developing operational strategies/tactics/plans:

- 1) Periodic sampling for microbiological typing/identification of the etiological agent of economically impactful diseases.
- 2) Developing treatment strategies, tactics, and programs in accordance with antibiogram results.
- 3) Concatenating and processing information obtained through classical microbiology to perform antibiograms at the species, farm, geographic area level, and calculating the multiple resistance index to antimicrobial preparations (MAR) for each considered unit (branch, farm, animal category, germ - sometimes averages hide serious deficiencies):
  - If the MAR value is  $< 0.2$ , periodic screening dependent on farm treatment results is recommended.
  - If the MAR value is  $\geq 0.2$ , an epidemiological investigation is recommended to identify possible causes (contamination, overuse, non-compliance with posology, etc.), and an in-depth analysis of AMR through genetic tests both for genes associated with used antibiotics and those not used in the farm/sector/branch.
- 4) Concatenating and processing information obtained through bacterial genotype analysis to measure the effectiveness of the AST diagnostic test for positive phenotypic resistance (DOR):
  - If the DOR value is  $\geq 10$ , the AST diagnostic test is efficient and usable for detecting genetically resistant isolates.
  - If the DOR value is  $< 10$ , in addition to the AST diagnostic test, genetic tests should continue (an aspect signaled especially in pigs).
- 5) Establishing bacterial genotype-therapeutic environment interaction (bacterial reaction norm) by quantifying the correlation (regression) between penetrance (PEN%) and the multiple resistance index (MAR) to support the decision regarding: continuing use, restricting use, or eliminating an antimicrobial preparation from the treatment program due to AMR/therapeutic inefficiency. If penetrance values exceed 0.2, the antibiotic should be withdrawn from the intervention plan due to the risk of using antibiotics in infections with phenotypically susceptible but genetically resistant microorganisms.

**Therefore, it is recommended that for managing the AMR phenomenon, indicators like MAR, penetrance, and the effectiveness of the positive phenotypic resistance diagnostic test (DOR) can guide the strategy for developing an antibiotic use program. However, more studies are needed to establish cut-off points for penetrance (genetic cut-off).**

## 7. Elements of Originality

The elements of originality in this PhD thesis refer to the unique and innovative aspects that differentiate the research from existing work in the field of antimicrobial resistance; advanced originality elements include:

- **Interdisciplinary approach:** to understand and combat the spread of antimicrobial resistance, the study involved integrating approaches from microbiology, molecular biology, growth technologies, epidemiology, and biostatistics.
- **Use of original data:** the data collected from a fairly large area are representative both in terms of the number of selected microbiological units and their extraction.
- **Innovative approach:** the study involved combining phenotypic approaches specific to classical microbiology (bacterial culture, antibiogram) with genotypic approaches specific to molecular genetics

(identification of ARGs); the results of the two approaches were juxtaposed through epidemiological methods (DOR, prevalence, penetrance) and biostatistics (phenotype/genotype correlations and regressions). To achieve associations between genotype and phenotype, both the frequency of a phenomenon manifestation (DOR P%) and its value (mean PEN%-MAR%) were considered.

- **Contribution to knowledge:** introducing linear or quadratic regressions to measure the intensity of links between phenotype and genotype is a new model (cheap, easily applicable) that complements the current approach (based on DOR) which, in the case of subunitary values, needs the support of molecular genetics (an expensive model requiring significant time and material resources).
- **Practical applicability:** following the recommended steps (chapter 6.2) allows the development of practical and innovative solutions regarding the use/restriction or elimination of antimicrobial preparations from therapeutic programs - the approach has potential applications in the pig farming industry, dairy cow exploitation, and/or society.

**By highlighting these elements of originality, the PhD thesis demonstrates its value and the significant contribution it can make to the research field - veterinary medicine.**