

**Universitatea de Științe Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara**



**Școala Doctorală Medicină Veterinară Timișoara**

**MOZA M.O. ALEX-CRISTIAN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CERCETĂRI PRIVIND FENOMENUL DE  
ANTIBIOREZISTENȚĂ LA TULPINI BACTERIENE  
IZOLATE DE LA VULPEA ROȘCATĂ  
(*VULPES VULPES*)**

**Conducător științific  
Prof. Univ. Dr. TÎRZIU EMIL**

**Timișoara  
2024**

**University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara**



**Doctoral School Veterinary Medicine Timișoara**

**MOZA M.O. ALEX-CRISTIAN**

# **DOCTORAL THESIS**

**RESEARCH ON THE PHENOMENON OF  
ANTIBIOTIC RESISTANCE IN BACTERIAL  
STRAINS ISOLATED FROM THE RED FOX  
(*VULPES VULPES*)**

**Scientific advisor  
Univ. Prof. Dr. TÎRZIU EMIL**

**Timișoara  
2024**

## Rezumatul tezei de doctorat

### Cercetări privind fenomenul de antibioretistență la tulpini bacteriene izolate de la vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*)

#### Prezenta teză conține:

Listă de abrevieri

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Stadiul actual al cunoașterii: 27 pagini

Cercetările proprii: 98 pagini

Tabele: 49

Figuri: 49

Surse bibliografice: 236

Anexe: 2

#### Introducere

Vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*) este una dintre cele mai răspândite specii de mamifere sălbatice, ocupând diverse habitate, inclusiv zone urbane și rurale din România. Vulpea joacă un rol ecologic important, dar este și gazdă pentru numeroase bacterii patogene cu potențial zoonotic, precum *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, rezistent la metilicină (MRSA), ș.a., care prezintă rezistență la substanțele antimicrobiene (AMR). Organizația Mondială a Sănătății (OMS) evidențiază fenomenul rezistenței antimicrobiene (AMR) ca una dintre cele mai mari amenințări la adresa sănătății globale. Aceasta apare din cauza utilizării incorecte sau excesive a antibioticelor în medicina umană, medicina veterinară și agricultură, facilitând astfel apariția bacteriilor rezistente. De asemenea, OMS promovează și susține interconectarea dintre sănătatea umană, sănătatea animală și cea a mediului înconjurător, prin conceptul "One Health". Acesta recunoaște faptul că animalele sălbatice, între care este inclusă și vulpea roșcată, pot juca un rol extrem de important în răspândirea bacteriilor rezistente la substanțe medicamentoase, ceea ce prezintă riscuri serioase pentru om și unele specii de animale domestice. Scopul principal al acestui studiu constă în evidențierea florei bacteriene și a gradului de antibioretistență, fenotipică și genotipică, la vulpea roșcată existentă în fondurile de vânătoare din vestul României, printr-o abordare interdisciplinară care îmbină, în special disciplinele de microbiologie, farmacologie, biologie moleculară.

#### I. Stadiul actual al cunoașterii

Această parte a tezei se extinde pe 27 de pagini (21.6 % din teză) și este structurată în două capitole, după cum urmează:

##### Capitolul 1. Încadrarea taxonomică, descrierea și caracterizarea vulpii roșcate

Vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*) este una dintre cele mai răspândite specii de mamifere sălbatice, din țara noastră, ocupând o varietate de habitate, de la păduri și câmpii, la zone urbane și rurale. Specia este extrem de ușor adaptabilă, cu un comportament omnivor și oportunist, ceea

ce îi permite să prospere în cele mai diverse medii. Din punct de vedere taxonomic, face parte din regnul *Animalia*, încregătura *Chordata*, clasa *Mammalia*, ordinul *Carnivora* și familia *Canidae*. Vulpea roșcată are o distribuție geografică vastă, fiind prezentă în aproape toate zonele lumii, respectiv America de Nord, Europa, Asia și părți importante din Africa de Nord și Australia, unde a fost introdusă de om. În România, vulpea roșcată este reprezentată de o populație de aproximativ 80.000 de indivizi, aceasta reprezentând una dintre cele mai mari și mai stabile populații din Europa.

Fiziologic, vulpea are o lungime de aproximativ 45-90 cm, o coadă de 30-55 cm și o greutate cuprinsă între 3 și 14 kg. Blana sa, predominant roșcată-portocalie, variază sezonier, devenind mai groasă în timpul iernii. Culoarea blănii și adaptabilitatea sa la diferite medii subliniază capacitatea vulpii de a supraviețui în condiții de mediu extrem de variate. Vulpea are o vedere nocturnă excelentă și, deși este un animal omnivor, are o dentiție adaptată pentru consumul cărnii. Practic însă, vulpea roșcată este un carnivor, cu o dietă diversificată, incluzând mamifere mici, păsări, insecte, fructe și deșeuri umane, ceea ce îi permite să se integreze ușor în habitate antropizate, inclusiv în mediile urbane, unde se hrănește din pubelele de gunoi și vânează animale precum porumbeii sau rozătoarele mici, aspecte ce evidențiază adaptabilitatea și reziliența sa deosebită.

Din punct de vedere comportamental, vulpea este un animal solitar, cu un teritoriu bine delimitat, dar prezintă interacțiuni sociale în timpul sezonului de împerechere. Femelele nasc între patru și șase pui, după o perioadă de gestație de 52 de zile, iar puii devin independenți în jurul vârstei de trei-patru luni. Vulpea roșcată trăiește de obicei până la trei ani în sălbăticie, dar poate ajunge până la 14 ani în captivitate.

## Capitolul 2. Flora bacteriană la vulpea roșcată

Acest capitol analizează flora bacteriană întâlnită la vulpea roșcată și relevă că aceasta constituie un rezervor important de germeni, pentru o varietate de bacterii, virusuri, fungi și paraziți, multe dintre acestea fiind patogene pentru animale și oameni. Dintre bacterii, vulpea găzduiește numeroase specii patogene, precum *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Leptospira* spp., *Brucella canis* ș.a., care sunt frecvent izolate din cavitatea bucală, dar și din anus, de pe piele și din tractul respirator al acesteia. De exemplu, *Salmonella* spp. și *Escherichia coli* sunt contractate prin consumul de hrană și apă contaminate, iar infecțiile cauzate de aceste bacterii pot duce la apariția unor gastroenterite și chiar la septicemie.

Dintre bacteriile Gram-negative, *Escherichia coli* și *Campylobacter* spp. sunt prezente în flora intestinală, iar dintre cele Gram pozitive, *Staphylococcus* spp. și *Corynebacterium* spp. colonizează pielea, protejând vulpea de acțiunea altor agenții patogeni externi. Din genurile *Escherichia* și *Campylobacter*, au fost izolate și identificate un număr mare de tulpini patogene, inclusiv tulpini enterotoxigene, enteropatogene și enterohemoragice. În plus, genuri bacteriene precum *Listeria* și *Yersinia* sunt responsabile de apariția unor infecții grave, caz în care vulpile pot acționa ca vectori importanți în transmiterea acestora la alte specii de animale și chiar la om.

Un aspect critic, evidențiat în studiul efectuat de noi, este fenomenul de rezistență la antibiotice (AMR), întâlnit frecvent și în populațiile de vulpi sălbatice. Studii recente, sau mai puțin recente, arată o prevalență ridicată a bacteriilor rezistente la substanțele antimicrobiene, în special la antibioticele beta-lactamice, tetracilină și aminoglicozide. Vulpea poate acționa ca un rezervor important pentru tulpinile bacteriene multirezistente, având potențialul de a disemina aceste tulpini prin contactul cu fauna domestică și mediul urban.

Cercetări efectuate în diferite țări ale Uniunii Europene arată că bacteriile izolate de la vulpea roșcată prezintă frecvent gene de rezistență la antibiotice, cum ar fi *blaTEM*, *blaCTX-M*, *tetK*, *mecA*, *msrA*, *AmpC* și *ermB*, contribuind la răspândirea rezistenței antimicrobiene. De exemplu, în Norvegia, 82,2% dintre probele de fecale, recoltate de la vulpea roșcată, au fost pozitive pentru *Escherichia coli*, cu o prevalență crescută a tulpinilor rezistente, în zonele cu densitate umană mare. În Polonia, prevalența stafilococilor și a enterococilor, cu rezistență multiplă la antibiotice, a fost semnificativă, iar în Italia, studiile au demonstrat prezența patogenilor din genul *Salmonella*, inclusiv a unor serotipuri rezistente la antibiotice.

Fenomenul de rezistență antimicrobiană, la vulpea roșcată, reprezintă un risc crescut pentru sănătatea publică, deoarece bacteriile rezistente pot fi transmise la alte specii de animale domestice sau sălbatice, inclusiv la oameni, prin intermediul interacțiunilor directe sau prin contaminarea mediului înconjurător. Habitatul urban expune vulpile la surse de hrană contaminate, iar comportamentele omnivore și teritorialitatea lor contribuie la diseminarea agenților patogeni cu care vin în contact.

Astfel, vulpea roșcată joacă un rol esențial în dinamica bacteriilor patogene și în evoluția fenomenului de antibioretistență în ecosistemele naturale și urbane. Monitorizarea continuă a acestor populații, precum și implementarea unor măsuri de gestionare eficientă a riscurilor, sunt esențiale pentru a preveni și controla răspândirea patogenilor și a bacteriilor rezistente la antibiotice.

## **II. Cercetările proprii**

Această parte se extinde pe 98 de pagini (78.4 % din teză) și include trei capitole mari, la care se adaugă concluziile generale și elementele de originalitate.

### **Capitolul 3. Cercetări privind flora bacteriană cu potențial patogen la vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*)**

#### ***Obiectivele studiului***

Scopul principal al studiului constă în izolarea și identificarea principalelor specii bacteriene cu potențial patogen, atât pentru fauna sălbatică, cât și pentru animalele domestice și om, în populația de vulpi roșcate (*Vulpes vulpes*) din 17 fonduri de vânătoare din vestul României.

#### ***Materiale și metode***

Cercetările au fost efectuate pe parcursul anilor 2022-2024, luându-se în studiu un număr de 240 probe, recoltate de la 120 de animale, în duplicat. Recoltarea probelor s-a făcut de la vulpi, de vârste și sexe diferite, după împușcare, din 17 fonduri de vânătoare din trei județe din vestul României, respectiv 14 fonduri de vânătoare din județul Timiș (Nădrag, Oloșag, Paniova, Făget, Traian Vuia, Sacoșul Mare, Boldur, Belinț-Chizătău, Buziaș, Moșnița, Visag, Valea Lungă, Margina, Surduc), un fond din județul Arad (Crocna-Zimbru) și două fonduri din județul Hunedoara (Zeicani și Silvaș).

Determinările au fost efectuate în laboratorul disciplinelor de Microbiologie și Imunologie, din cadrul Facultății de Medicină veterinară Timișoara. Menționăm că, metodologia de lucru a fost cea standard, în cazul însămânțărilor primare, respectiv în/pe medii uzuale simple, din care s-au făcut reînsămânțări pe medii de cultură selective, atât pentru bacterii Gram negative, cât și Gram pozitive. Pentru identificarea bacteriilor Gram negative au fost utilizate mediile speciale Levine, TBX, XLD, Rambach și Brilliance™ *Salmonella*, iar pentru cele Gram pozitive, mediile

Chapman, Bayrd-Parker și Oxoid Chromogenic *Listeria*. Ulterior, din coloniile izolate, dezvoltate pe suprafața mediilor de cultură selective, au fost efectuate reînsămânțări pe agar, în vederea obținerii unor culturi pure, de 24 ore, necesare pentru identificarea speciilor bacteriene cu echipamentul Vitek 2 Compact.

### **Rezultate și discuții**

Din coloniile bacteriene, cu dezvoltare specifică pe mediile de cultură speciale, a fost efectuat examenul bacterioscopic, pe frotiuri colorate prin metoda Gram, prin care s-au pus în evidență caracterele morfologice ale germeilor (forma, modul de grupare, afinitatea tinctorială).

Coroborând principalele aspectele culturale, dezvoltate pe mediile de cultură selective, cu aspectele morfologice, puse în evidență la examenul bacterioscopic, am putut confirma prezența mai multor specii bacteriene, dintre care menționăm speciile încadrate în genurile: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, dar și *Listeria*.

Din totalul de 160 de probe, prelevate de la cele 80 de vulpi roșcate, au fost izolate 162 de tulpini bacteriene, încadrate în 11 genuri, respectiv cinci Gram negative (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* și *Shigella*) și șase Gram pozitive (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc*, *Kocuria* și *Aerococcus*).

Încadrarea speciilor a fost confirmată în urma determinărilor cu echipamentul Vitek 2 Compact. Astfel, dintre cele 73 de tulpini Gram negative, majoritatea (76.70%) au aparținut speciei *E. coli* și unsprezece tulpini au fost încadrate în genul *Proteus* (15.07%). La acestea s-au adăugat și câte două tulpini de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (2.74%), *Shigella sonnei* (2.74%) și *Enterobacter* (2.74%). Bacteriile Gram pozitive au aparținut, majoritatea, genului *Staphylococcus*, respectiv *Staphylococcus sciuri* (23.44%), *Staphylococcus vitulinus* (14.53%), *Staphylococcus xylosus* (12.5%), *Staphylococcus aureus* (12.5) și *Staphylococcus pseudintermedius* (11%). Celelalte specii Gram pozitive identificate au fost: *Enterococcus faecium* (12.36%), *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kocuria kristinae* și *Aerococcus viridans*.

## **Capitolul 4. Cercetări privind rezistența fenotipică la antimicrobiene a unor tulpini bacteriene izolate de la vulpea roșcată**

### **Obiectivele studiului**

Scopul principal al cercetării a constat în caracterizarea fenotipică a antibioretistenței tulpinilor de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. și *Enterococcus faecium*. De asemenea, secundar, s-a efectuat și o evaluare a extinderii fenomenului de rezistență la antimicrobiene în rândul vulpilor împușcate în fondurile cinegetice luate în studiu.

### **Materiale și metode**

Testarea susceptibilității antimicrobiene fenotipice a tulpinilor bacteriene luate în studiu s-a realizat, într-o primă etapă, prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, conform ghidurilor EUCAST (2024) și CLSI (2024). Pentru a se asigura acuratețea rezultatelor, s-au utilizat tulpinile de referință pozitivă *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, împreună cu un martor negativ. În acest scop s-au folosit microcomprimate impregnate cu substanțe antibacteriene diferite, în concentrații diferite, aplicate ulterior pe suprafața mediului de cultură, inoculat cu suspensia bacteriană din tulpina supusă testării. Pentru acest experiment, au fost luate în studiu atât specii Gram pozitive cât și Gram negative. Dintre bacteriile Gram negative au fost supuse testării 73 de tulpini, aparținând următoarelor specii: *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* spp., *S. enterica* și *Shigella sonnei*. Tulpinile Gram pozitive au fost în număr de 75, fiind reprezentate de speciile *E. faecium*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. sciuri*,

*S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. lentus*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. simulans*, *S. chromogenes* și *S. warneri*.

În a doua etapă, studiul susceptibilității antimicrobiene fenotipice a fost realizat cu echipamentul Vitek2 Compact. Au fost testate 41 de tulpini bacteriene Gram negative, care aparțin speciilor *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. sonnei* și *S. enterica*, iar dintre izolatele Gram pozitive au fost selectate 27 de tulpini din genul *Staphylococcus*, cu următoarele specii: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. lentus*, *S. chromogenes* și *S. felis*.

### **Rezultate și discuții**

Rezultatele privind susceptibilitatea antimicrobiană a unor specii bacteriene, determinată prin metoda disc-difuzimetrică și cu echipamentul Vitek2 Compact, au variat în funcție de fondul de vânătoare din care s-au prelevat probele și de specia bacteriană testată. Astfel, la izolatele de *Escherichia coli*, izolate din probele prelevate de la vulpile din județul Timiș, s-a constatat o rezistență semnificativă la ceftazidim, cu valori cuprinse între 63% și 80%. În general, la speciile Gram negative, cele mai mari rate de rezistență au fost înregistrate la amikacină (64%), tetraciclină (58%), gentamicină (57%), ciprofloxacină (56%), carbapeneme (48%) și cefalosporine (ceftazidim 59%, cefalexin 48%), iar cele mai mici au fost constatate la sulfametoxazol/trimethoprim (13%), cloramfenicol (14%), nitrofurantoin (22%) și cefalexin (22%).

Fenomenul de multirezistență a fost constatat frecvent la tulpinile de *Escherichia coli*, în special la cele izolate din fondurile de vânătoare Făget, Traian Vuia și Margina (63% din izolate), iar în alte fonduri, precum Buziaș și Moșnița, acest procent a fost de 57,1%. Și la tulpinile de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* spp. și *Shigella sonnei* s-a constatat prezența unor fenotipuri multirezistente.

La speciile Gram pozitive, rate ridicate ale rezistenței la substanțele antimicrobiene s-au înregistrat față de penicilină (70%), clindamicină (67%), amoxicilină/acid clavulanic (53%), sulfametoxazol/trimethoprim (53%), gentamicină (50%) și cefoxitin (43%), cu mențiunea că 12, dintre tulpinile de stafilococi, au fost meticilino-rezistente. Fenomenul de rezistență multiplă a fost constatat la 67% dintre izolatele din fondurile vânătoarești Nădrag și Surduc și la 50% din cele izolate din fondurile cinegetice Buziaș și Moșnița. Pe de altă parte, cea mai scăzută rată a rezistenței a fost înregistrată față de cloramfenicol (0%), amikacină (4%), cefalexin (6%), imipenem (7%), eritromicină (9%) și kanamicină (13%).

Izolatele de *Enterococcus faecium* au prezentat o rezistență crescută la tetraciclină (91%) și imipenem (82%), respectiv ciprofloxacină (73%), eritromicină și vancomicină (64%). În ansamblu, rezultatele obținute cu echipamentul Vitek 2 au confirmat în mare măsură fenotipurile de rezistență identificate prin metoda disc-difuzimetrică.

Menționăm că, s-au constatat diferențe semnificative, în ceea ce privește rezistența bacteriană, în funcție de zona geografică, cu un grad mai ridicat de rezistență la izolatele provenite de la vulpile aflate în fondurile cinegetice din zonele mai populate de om și influențate de activitățile umane, aspect ce evidențiază impactul acestora asupra răspândirii antibioretistenței în mediul silvatic.

## Capitolul 5. Cercetări privind rezistența genotipică la antimicrobiene a unor tulpini bacteriene izolate de la vulpe

### Obiectivele studiului

Obiectivul fundamental al cercetării a constat în caracterizarea rezistenței genotipice la substanțele antimicrobiene, prin tehnici de biologie moleculară (PCR), a unor tulpini bacteriene aparținând speciilor *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. și *Staphylococcus* spp., izolate de la vulpea roșcată, din cele 17 fonduri de vânătoare din Vestul României.

### Materiale și metode

În cadrul acestui studiu au fost incluse izolatele bacteriene supuse testării susceptibilității la substanțele antimicrobiene cu echipamentul Vitek 2 Compact.

Pentru extragerea ADN-ului bacterian, a fost utilizat kit-ul *NucleoSpin® DNA Forensic* urmând aceleași etape, atât pentru bacteriile Gram pozitive, cât și pentru cele Gram negative. Cantitatea și calitatea ADN-ului bacterian, izolat din tulpinile luate în studiu, a fost verificat prin metoda spectrofotometrică, cu ajutorul spectrofotometrului *UV-VIS Nanodrop 8000*, fiind necesar, pentru analiza PCR, un minim de 25 ng de ADN bacterian. Pentru analiza prin PCR s-a utilizat echipamentul *Eppendorf Mastercycler PRO S 6325 Thermal Cycler*, amestecul de amplificare fiind de 25  $\mu$ l pentru fiecare genă de rezistență examinată.

Pentru determinarea susceptibilității și rezistenței speciilor Gram negative, la substanțele antimicrobiene, s-au ales șase gene de rezistență, corespondente cu zece dintre substanțele medicamentoase, iar în cazul speciilor Gram pozitive s-au ales opt gene de rezistență, care corespund cu 14 substanțe antimicrobiene. Pentru evidențierea genelor de rezistență s-a utilizat electroforeza în gel de agaroză. Analiza rezistenței genotipice s-a efectuat prin calculul a doi indici, respectiv penetranța (P%) și raportul cotelor (RC), conform formulelor de calcul matematic.

### Rezultate și discuții

Investigațiile asupra genelor de rezistență *ampC*, *blaCMY*, *blaSHV*, *aac(6')-aph(2'')*, *aac(3)-IV* și *tetK*, la cele 41 de tulpini Gram negative, au relevat că aproape 44% dintre acestea posedă una sau mai multe dintre aceste gene. La tulpinile Gram negative, rezistente și susceptibile fenotipic, genotipurile de rezistență au fost prezente în 51%, respectiv 37% dintre cazuri. Penetranța genelor *ampC*, *blaSHV* și *blaCMY* a avut valori ridicate pentru ceftazidim (79%, 88%, respectiv 67%), în timp ce *blaSHV* a înregistrat o penetranță mare la cefoxitină (83%) și cefalexină (71%). În cazul genei *aac(6')-aph(2'')* s-a constatat o penetranță ridicată pentru toate aminoglicozidele, cu 86% pentru amikacină, 79% pentru gentamicină și 71% pentru tobramicină.

S-au constatat valori predictive supraunitare ale raportului cotelor (RC) pentru genele *ampC* (ampicilină, amoxicilină/acid clavulanic, cefoxitin, ceftazidim), *blaSHV* la toate antibioticele luate în studiu, *blaCMY* (ampicilină, amoxicilină/acid clavulanic, cefalexină, cefoxitin), *aac(6')-aph(2'')*, *aac(3)-IV* și *tetK* la toate antibioticele testate.

În cazul celor 27 de tulpini Gram pozitive, genele *blaZ*, *mecA*, *aac(6')-aph(2'')*, *tetK*, *msrA*, *ermB* și *ermC* au fost prezente în 47% dintre cazuri. Menționăm că, la izolatele Gram pozitive, rezistente și susceptibile fenotipic, genotipurile de rezistență au fost identificate în 58%, respectiv 37% dintre cazuri. La testarea cefoxitinei, prevalența genei *mecA*, în izolatele rezistente, respectiv susceptibile din punct de vedere fenotipic, a fost de 92%, respectiv 40%. Menționăm că, screening-ul cu cefoxitină este utilizat în detectarea tulpinilor de *Staphylococcus* spp., purtătoare a genei *mecA*, de unde reiese că stafilococii sunt meticilino-rezistenți (MRS).

Penetranța genelor *blaZ* (80% pentru penicilină), *mecA* (71% pentru oxacilină și 94% pentru penicilină), *msrA* (75%), *tetK* (67%) și *ermC* (68%) a fost ridicată. Raporturile cotelor au



fost supraunitare pentru genele *blaZ* la toate antibioticele, *mecA* la oxacilină, penicilină, amoxicilină/acid clavulanic, cefalotin și cefoxitin, *aac(6')-aph(2'')* la gentamicină, kanamicină și amikacină, *tetK* la tetraciclină, *msrA* la clindamicină, și *ermC* la eritromicină și clindamicină.

Dat fiind faptul că în izolatele bacteriene prelevate de la populațiile sălbatice de vulpe roșcată, din fondurile cinegetice situate în vestul României, există gene de rezistență, unele la niveluri îngrijorător de crescute, sursa acestora ar trebui în continuare investigată, punând un accent deosebit pe originile acestora, atât asociate activităților umane, cât și a animalelor de fermă.

### III. Concluzii generale și recomandări

#### Capitolul 6. Concluzii generale

În urma studiilor efectuate, cele mai importante concluzii rezultate sunt:

➤ Cercetările privind rolul de purtător a unor patogeni cu potențial zoonotic, la vulpea roșcată, a fost confirmată prin identificarea unui număr mare de specii bacteriene de interes medical, dintre care putem menționa: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* sau *Listeria ivanovii*.

➤ *Proteus mirabilis* și *Proteus vulgaris* au fost semnalate pentru prima dată în țara noastră la vulpea roșcată, acestea fiind implicate obișnuit în procese patologice la animalele de companie (câini, pisici), precum și la om.

➤ A fost semnalată, pentru prima dată, la vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*) din România, și prezența bacteriilor cu potențial zoonotic din genul *Listeria*. Prezența acestora în fauna sălbatică confirmă existența unor surse de contaminare în mediul înconjurător și riscul de propagare a patogenului la speciile de animale de vânat.

➤ Izolarea agenților patogeni cu potențial zoonotic, de la vulpea roșcată, din vestul României, evidențiază riscuri semnificative pentru sănătatea publică, sau a faunei și subliniază necesitatea monitorizării și gestionării contaminării faunei sălbatice.

➤ Pe baza rezultatelor obținute, putem să afirmăm că în populațiile de vulpe roșcată din Vestul României pot circula și alte specii bacteriene cu potențial patogen, diferite de cele izolate de noi, pentru izolarea și identificarea cărora recomandăm continuarea cercetărilor, prin utilizarea unor medii de cultură speciale, precum și prin efectuarea de teste serologice și de biologie moleculară la fiecare animal.

➤ La majoritatea animalelor, de la care s-au prelevat probe, au fost izolate tulpini bacteriene cu rezistență fenotipică și genotipică la substanțele antimicrobiene de interes clinic, aspect demonstrat consecutiv testărilor efectuate prin metodele disc-difuzimetrică, Vitek 2 Compact, și ulterior prin evidențierea genotipului de rezistență prin analiza PCR.

➤ La animalele din fondurile cinegetice în arealul cărora sunt incluse zone semi-urbane, rurale, ape curgătoare sau stătătoare, precum și unități de creștere a animalelor domestice de interes economic s-a constatat o diversitate mult mai mare, atât în ceea ce privește complexitatea microorganismelor cu potențial zoonotic identificate, cât și a fenotipurilor de antibiorezistență manifestate de acestea.

➤ Deși costurile obținerii datelor pentru calculul indicilor *Penetranță (%)*, respectiv, *Raportul cotelor (RC)* sunt mari, aceștia oferă date importante privind eficiența antimicrobiană a unui preparat medicamentos, respectiv, măsoară eficacitatea unui test utilizat pentru determinarea

antibiorezistenței fenotipice, avantajul constând în faptul că ambii indicatori iau în calcul atât rezistența fenotipică, cât și genotipică.

➤ La speciile Gram negative cele mai ridicate rate ale antibiorezistenței s-au înregistrat față de amikacină (64%), tetraciline (58%), gentamicină (57%), ciprofloxacină (56%), carbapeneme (48%) și cefalosporine (ceftazidim 59%, cefalexin 48%).

➤ La speciile Gram pozitive cele mai ridicate rate ale rezistenței la antimicrobiene s-au înregistrat față de penicilină (70%), clindamicină (67%), amoxicilină/acid clavulanic (53%), sulfametoxazol/trimetoprim (53%), gentamicină (50%), cefoxitin (43%). De asemenea, 12 tulpini de stafilococi au fost identificate cu metilino-rezistență.

➤ Cele 11 tulpini de *Enterococcus faecium* au fost rezistente la sulfametoxazol/trimetoprim (100%), dar și la tetraciclină (91%), imipenem (82%), ciprofloxacină (73%), eritromicină și vancomicină (64%), cu mențiunea că la zece tulpini s-a constatat și fenomenul de multirezistență la toate antibioticele luate în studiu.

➤ Rezultatele obținute cu echipamentul Vitek 2 Compact au confirmat în mare măsură fenotipurile de rezistență identificate prin metoda disc-difuzimetrică.

➤ S-au constatat diferențe semnificative, în ceea ce privește rezistența bacteriană, dependent de zona geografică, un grad mai ridicat de rezistență fiind constatat la izolatele provenite de la vulpile aflate în fondurile cinegetice din zonele mai populate de oameni și influențate de activitățile umane, aspect ce evidențiază impactul acestora asupra răspândirii antibiorezistenței în mediul sălbatic.

#### IV. Elemente de originalitate

##### Capitolul 7. Elemente de originalitate

- Este prima cercetare mai amplă privind flora bacteriană și rezistența antimicrobiană la speciile izolate de la vulpea roșcată (*Vulpes vulpes*), din fondurile de vânătoare din Vestul României.

- Au fost identificate pentru prima dată la noi în țară, la vulpea roșcată din fondurile cinegetice din Vestul României, mai multe specii de bacterii Gram negative, dintre care menționăm în special *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Shigella sonnei* și *Proteus vulgaris*.

- De asemenea, au fost identificate, tot în premieră pentru țara noastră, și specii bacteriene Gram pozitive, dintre care menționăm *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* sau *Enterococcus faecium*.

- Studiul a fost efectuat pe un areal mare, probele fiind colectate de la un număr reprezentativ de vulpi sălbatice, din 17 fonduri de vânătoare, localizate în trei județe din vestul țării.

- Cercetarea a adoptat o abordare interdisciplinară care îmbină atât elemente de bacteriologie specială, farmacologie, biologie moleculară și epidemiologie.

- Studiul a îmbinat tehnicile de lucru din microbiologia clasică, folosite pentru izolarea, identificarea și testarea susceptibilității la substanțele antimicrobiene, cu tehnici moderne de genetică moleculară, pentru identificarea genelor de rezistență.

## Summary of the PhD thesis

### Research on the phenomenon of antibiotic resistance in bacterial strains isolated from the red fox (*Vulpes vulpes*)

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

*List of abbreviations*

*Summaries in Romanian and English*

*Introduction*

*Current state of knowledge: 27 pages*

*Own research: 98 pages*

*Tables: 49*

*Figures: 49*

*Bibliographic sources: 236*

*Annexes: 2*

#### **Introduction**

The red fox (*Vulpes vulpes*) is one of the most widespread species of wild mammals, occupying various habitats, including urban and rural areas in Romania. The fox plays an important ecological role, but it is also a host for numerous pathogenic bacteria with zoonotic potential, such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which show antibiotic resistance (AMR). The World Health Organization (WHO) highlights the phenomenon of antimicrobial resistance (AMR) as one of the biggest threats to global health. This occurs due to the incorrect or excessive use of antibiotics in human medicine, veterinary medicine, and agriculture, thus facilitating the emergence of resistant bacteria. Moreover, WHO promotes the interconnection between human, animal, and environmental health through the "One Health" concept. It recognizes that wild animals such as the red fox can play a significant role in the spread of drug-resistant bacteria, which pose serious risks to humans and domestic animal species. The main purpose of this study is to highlight the bacterial flora and the degree of antibiotic resistance, both, phenotypic and genotypic, in the red fox existing in hunting funds in western Romania, through an interdisciplinary approach that combines the disciplines of microbiology, pharmacology, and molecular biology.

#### **I. Current state of knowledge**

This part of the thesis extends over 27 pages (21.6 % of the thesis) and is structured in two chapters, as follows:

##### **Chapter 1. Taxonomy, description and characterization of the red fox**

The red fox (*Vulpes vulpes*) is one of the most widespread wild mammal species in our country, occupying a variety of habitats, from forests and plains to urban and rural areas. The species is extremely adaptable, with omnivorous and opportunistic behavior, which allows it to thrive in diverse environments. Taxonomically, it belongs to the kingdom *Animalia*, the phylum

*Chordata*, the class *Mammalia*, the order *Carnivora* and the family *Canidae*. The red fox has a wide geographic distribution, being present in almost every corner of the world, including North America, Europe, Asia, and parts of North Africa and Australia, where it has been introduced by man. In Romania, the fox is represented by a population of approximately 80,000 individuals, which represents one of the largest and most stable populations in Europe.

Physiologically, the fox has an approximate length of 45-90 cm, a tail of 30-55 cm and a weight between 3 and 14 kg. Its fur, predominantly reddish-orange, varies seasonally, becoming thicker in winter. The color of the fur and its adaptability to extremely different environments underline the fox's ability to survive in varied conditions. The fox has excellent night vision and, despite being an omnivorous animal, its dentition is adapted for eating meat. It is a carnivore with a varied diet, including small mammals, birds, insects, fruit, and human waste, which allows it to easily integrate into anthropogenic habitats, including urban environments, where it forages from garbage bins and hunts animals such as pigeons, or rodents, highlighting its adaptability and resilience.

From a behavioral point of view, the fox is a solitary animal, with a well-defined territory, but exhibits social interactions during the mating season. Females give birth to between four and six cubs after a gestation period of 52 days, and the cubs become independent around three to four months of age. The red fox usually lives up to three years in the wild but can live up to 14 years in captivity.

## **Chapter 2. Bacterial flora in the red fox**

This chapter analyzes the bacterial flora found in the red fox and reveals that it constitutes an important reservoir of germs for a variety of bacteria, viruses, fungi, and parasites, many of which are pathogenic to animals and humans. Among the bacteria, the fox hosts many pathogenic species, such as *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Leptospira* spp., *Brucella canis* and so on, which are frequently isolated from the oral cavity, but also from the anus, from the skin and from its respiratory tract. For example, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* are contracted through consumption of contaminated food and water, and infections caused by these bacteria can lead to gastroenteritis and even septicemia.

Among the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. are present in the intestinal flora, and among the Gram-positive ones, *Staphylococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. colonize the skin, protecting the fox from external pathogens. From the genera *Escherichia* and *Campylobacter*, pathogenic strains have been isolated and identified, including enterotoxigenic, enteropathogenic and enterohemorrhagic strains. In addition, bacterial genera such as *Listeria* and *Yersinia* are responsible for the occurrence of serious infections, in which case foxes can act as important vectors in their transmission to other animal species and even to humans.

A critical aspect, highlighted in our study, is the phenomenon of antibiotic resistance (AMR) frequently found in wild fox populations. Recent, or less recent, studies show a high prevalence of bacteria resistant to antimicrobial substances, especially beta-lactam, tetracycline, and aminoglycoside antibiotics. The fox may act as an important reservoir for multidrug-resistant bacterial strains, having the potential to disseminate these strains through contact with domestic fauna and the urban environment.

Studies in different regions of the European Union show that bacteria isolated from foxes frequently show antibiotic resistance genes such as *blaTEM*, *blaCTX-M*, *tetK*, *mecA*, *msrA*, *AmpC* and *ermB*, contributing to the spread of antimicrobial resistance. For example, in Norway, 82.2%

of faecal samples collected from foxes were positive for *Escherichia coli*, with an increased prevalence of resistant strains in areas of high human density. In Poland, the prevalence of staphylococci and enterococci with multiple antibiotic resistance was significant, and in Italy, studies showed the presence of *Salmonella* pathogens with antibiotic-resistant serotypes.

The phenomenon of antimicrobial resistance in the red fox represents an increased risk to public health, as resistant bacteria can be transmitted to other domestic and wild animal species, or humans, through direct interactions or through environmental contamination. The urban habitat exposes foxes to contaminated food sources, and their omnivorous behaviors and territoriality contribute to the dissemination of pathogens.

Thus, the red fox plays an essential role in the dynamics of pathogenic bacteria and in the evolution of the phenomenon of antibiotic resistance in natural and urban ecosystems. Continuous monitoring of these populations, as well as the implementation of effective risk management measures, are essential to prevent and control the spread of pathogens and antibiotic-resistant bacteria.

## **II. Own research**

This part extends over 98 pages (78.4 % of the thesis) and includes three large chapters, to which general conclusions and original elements are added.

### **Chapter 3. Research on the potentially pathogenic bacterial flora in the red fox**

#### ***Goal and objectives***

The main aim of the study is the isolation and identification of the main bacterial species with pathogenic potential, both for wildlife, domestic animals and humans, in the population of red foxes, from 17 hunting funds in western Romania.

#### ***Materials and methods***

The research was carried out during the years 2022-2024, studying a number of 240 samples, collected from 120 animals, in duplicate. The samples were collected from foxes of different ages and sexes, after being hunted, from 17 hunting funds from three counties in western Romania, respectively 14 hunting funds in Timiș county (Nădrag, Oloșag, Paniova, Făget, Traian Vuia, Sacoșul Mare, Boldur, Belinț-Chizătău, Buziaș, Moșnița, Visag, Valea Lungă, Margina, Surduc), one fund from Arad county (Crocna-Zimbru) and two funds from Hunedoara county (Zeicani and Silvaș).

The determinations were made in the laboratory of the discipline of Microbiology and Immunology, within the Timișoara Faculty of Veterinary Medicine. We mention that the working methodology was the standard one, in the case of primary inoculations, respectively in/on simple usual media, from which re-inoculations were made on selective culture media, both for Gram negative and Gram-positive bacteria. Levine, TBX, XLD, Rambach and Brilliance™ *Salmonella* special media were used to identify Gram-negative bacteria, and Chapman, Bayrd-Parker and Oxoid Chromogenic Listeria media were used for Gram-positive ones. Later, the isolated colonies, developed on the surface of the selective media, were reseeded on agar, in order to obtain pure, 24-hour cultures, necessary for the identification of bacterial species with the Vitek 2 Compact equipment.

#### ***Results and discussions***

From the bacterial colonies, with specific development on special culture media, were subjected to a bacterioscopic examination, on smears stained by the Gram method, through which

the main morphological characters of the germs were highlighted (shape, way of grouping, tinctorial affinity)

Finally, corroborating the main cultural aspects, developed on selective culture media, with the morphological aspects, highlighted during the bacterioscopic examination, we were able to confirm the presence of several bacterial species, among which we mention the species belonging to the genera: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, but also *Listeria*.

From the total of 160 samples, taken from 80 red fox carcasses, 162 bacterial strains were isolated, belonging to 11 genera, namely five Gram negative genera (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* and *Shigella*) and six Gram positive (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc*, *Kocuria* and *Aerococcus*).

The classification of the species was confirmed following determinations with the Vitek 2 Compact equipment. Thus, among the 73 Gram negative strains, the majority (76.70%) belonged to the *E. coli* species and eleven strains were classified in the *Proteus* genus (15.07%). Two strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (2.74%), *Shigella sonnei* (2.74%) and *Enterobacter* (2.74%). The majority of Gram-positive bacteria belonged to the genus *Staphylococcus*, respectively *Staphylococcus sciuri* (23.44%), *Staphylococcus vitulinus* (14.53%), *Staphylococcus xylosum* (12.5%), *Staphylococcus aureus* (12.5) and *Staphylococcus pseudintermedius* (11%). The other Gram-positive species identified were. *Enterococcus faecium* (12.36%), *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kocuria kristinae* and *Aerococcus viridans*.

#### **Chapter 4. Research on phenotypic antimicrobial resistance of some bacterial strains isolated from the red fox**

##### ***Goal and objectives***

The main aim of the research consisted in the phenotypic characterization of the antibiotic resistance of strains of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus faecium*. Also, secondarily, an evaluation of the extent of the phenomenon of antimicrobial resistance among the hunted foxes was carried out, within the hunting funds included in the study.

##### ***Materials and methods***

Phenotypic antimicrobial susceptibility testing of the studied bacterial strains was performed, in a first step, by the Kirby-Bauer disc-diffusimetric method, according to EUCAST (2024) and CLSI (2024) guidelines. To ensure the accuracy of the results, the positive reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used, along with a negative control. For this purpose, micro-tablets impregnated with different antibacterial substances, in certain concentrations, were used, subsequently applied to the surface of the culture media, inoculated with the bacterial suspension from the tested strain. For this experiment, both Gram-positive and Gram-negative species were studied. Among Gram negative bacteria, 73 strains were tested, belonging to the following species: *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter* spp., *S. enterica* and *Shigella sonnei*. There were 75 Gram positive strains, represented by the species *E. faecium*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. xylosum*, *S. lentus*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. simulans*, *S. chromogenes* and *S. warneri*.

In the second step, the study of phenotypic antimicrobial susceptibility was carried out with the Vitek 2 Compact equipment. For this, 41 Gram-negative bacterial strains were tested, which

belong to the species *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. sonnei* and *S. enterica*, and among the Gram-positive isolates 27 strains from the genus *Staphylococcus* were selected, with the following species: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. lentus*, *S. chromogenes* and *S. felis*.

### **Results and discussions**

The results regarding the antimicrobial susceptibility of some bacterial species, determined by the disc-diffusimetric method and with the Vitek 2 Compact equipment, varied depending on the hunting background and the tested bacterial species. Thus, in *E. coli* isolates, isolated from samples taken from foxes in Timiș County, a significant resistance to ceftazidime was observed, with values between 63% and 80%. In general, among Gram-negative species, the highest rates of resistance were to amikacin (64%), tetracyclines (58%), gentamicin (57%), ciprofloxacin (56%), carbapenems (48%), and cephalosporins (ceftazidime 59%, cephalexin 48%), and the lowest were for sulfamethoxazole/trimethoprim (13%), chloramphenicol (14%), nitrofurantoin (22%) and cephalexin (22%).

The phenomenon of multiresistance was frequently observed in the strains of *Escherichia coli* strains, especially in those isolated from the Făget, Traian Vuia and Margina hunting funds (63% of isolates), and in other funds, such as Buziaș and Moșnița, this percentage was 57, 1% The presence of multiresistant phenotypes was also found in strains of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* spp. and *Shigella sonnei*.

In Gram-positive species, high rates of antimicrobial resistance were recorded against penicillin (70%), clindamycin (67%), amoxicillin/clavulanic acid (53%), sulfamethoxazole/trimethoprim (53%), gentamicin (50 %) and cefoxitin (43%), with the mention that 12 of the staphylococci strains were methicillin-resistant. The phenomenon of multiple resistance was found in 67% of the isolates from the Nădrag and Surduc hunting funds and in 50% of the isolates from the Buziaș and Moșnița hunting funds. On the other hand, the lowest rate of resistance was recorded against chloramphenicol (0%), amikacin (4%), cephalexin (6%), imipenem (7%), erythromycin (9%) and kanamycin (13%).).

*Enterococcus faecium* isolates showed increased resistance to tetracycline (91%) and imipenem (82%), respectively ciprofloxacin (73%), erythromycin and vancomycin (64%). Overall, the results obtained with the Vitek 2 equipment largely confirmed the resistance phenotypes identified by the disc-diffusimetric method.

We have noticed that significant differences in bacterial resistance were found, depending on the geographical area, with a higher degree of resistance in isolates from foxes in hunting grounds in areas more populated by humans and influenced by human activities, aspect that highlights their impact on the spread of antibiotic resistance in the sylvatic environment.

## **Chapter 5. Research on genotypic antimicrobial resistance of some bacterial strains isolated from the red fox**

### **Goal and objectives**

The fundamental objective of the research was to characterize the genotypic resistance to antimicrobial substances, by molecular biology (PCR) techniques, of some bacterial strains belonging to the species *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. and *Staphylococcus* spp., isolated from the red fox, from the 17 hunting funds in Western Romania.

### **Materials and methods**

Bacterial isolates subjected to antimicrobial susceptibility testing with the Vitek 2 Compact equipment were included in this study.

For bacterial DNA extraction, the *NucleoSpin® DNA Forensic* kit was used following the same steps for both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The quantity and quality of the bacterial DNA, isolated from the strains taken in the study, was checked by the spectrophotometric method, with the help of the *UV-VIS spectrophotometer Nanodrop 8000*, being necessary, for the PCR analysis, a minimum of 25 ng of bacterial DNA. The *Eppendorf Mastercycler PRO S 6325 Thermal Cycler* equipment was used for PCR analysis, the amplification mixture being 25 µl for each resistance gene examined.

To determine the susceptibility and resistance of Gram-negative species, to antimicrobial substances, six resistance genes were chosen, corresponding to ten of the medicinal substances, and in the case of Gram-positive species, eight resistance genes were chosen, which correspond to 14 antimicrobial substances. Agarose gel electrophoresis was used to identify resistance genes. The analysis of genotypic resistance was performed by calculating two indices, namely *penetrance* (P%) and *odds ratio* (RC), according to mathematical calculation formulas.

### **Results and discussions**

Investigations on the *ampC*, *blaCMY*, *blaSHV*, *aac(6')-aph(2'')*, *aac(3)-IV* and *tetK* resistance genes in the 41 Gram-negative strains revealed that nearly 44% of them possess one or more of these genes. In resistant and phenotypically susceptible Gram-negative strains, resistance genotypes were present in 51% and 37% of cases, respectively. *AmpC*, *blaSHV*, and *blaCMY* gene penetrance were high for ceftazidime (79%, 88%, and 67%, respectively), while *blaSHV* showed high penetrance for cefoxitin (83%) and cephalixin (71%). In the case of the *aac(6')-aph(2'')* gene, a high penetrance was found for all aminoglycosides, with 86% for amikacin, 79% for gentamicin and 71% for tobramycin.

Over-unit predictive values of the odds ratio (RC) were found for the genes *ampC* (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftazidime), *blaSHV* to all antibiotics, *blaCMY* (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalixin, cefoxitin), *aac(6')-aph(2'')*, *aac(3)-IV* and *tetK* to all antibiotics tested.

In the case of the 27 Gram-positive strains, the *blaZ*, *mecA*, *aac(6')-aph(2'')*, *tetK*, *msrA*, *ermB* and *ermC* genes were present in 47% of the cases. We mention that in the Gram-positive, resistant and phenotypically susceptible isolates, resistance genotypes were identified in 58% and 37% of cases, respectively. When testing cefoxitin, the prevalence of the *mecA* gene in resistant and phenotypically susceptible isolates was 92% and 40%, respectively. We mention that cefoxitin screening is used in the detection of strains of *Staphylococcus* spp. carrying the *mecA* gene, from which it appears that the staphylococci are methicillin-resistant (MRS).

The penetrance of the *blaZ* (80% for penicillin), *mecA* (71% for oxacillin and 94% for penicillin), *msrA* (75%), *tetK* (67%) and *ermC* (68%) genes was high. Odds ratios were above unity for the *blaZ* genes to all antibiotics, *mecA* to oxacillin, penicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin and cefoxitin, *aac(6')-aph(2'')* to gentamicin, kanamycin and amikacin, *tetK* to tetracycline, *msrA* to clindamycin, and *ermC* to erythromycin and clindamycin.

Given the fact that in the bacterial isolates, collected from wild populations of red foxes, from hunting grounds located in western Romania, there are resistance genes, some at worryingly high levels, their source should be further investigated, with a special emphasis on their origins, both associated with human activities and farm animals.



### III. General conclusions and recommendations

#### Chapter 6. General conclusions and recommendations

Following the studies carried out, the most important conclusions are:

➤ Research on the role of the carrier of some pathogens with zoonotic potential, in the red fox, was confirmed by the identification of a large number of bacterial species of medical interest, among which we can mention: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* or *Listeria ivanovii*.

➤ *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* were reported for the first time in our country in the red fox, they are usually involved in pathological processes in pets (dogs, cats), as well as in humans.

➤ It was reported, for the first time, in the red fox (*Vulpes vulpes*) from Romania, and the presence of potentially zoonotic bacteria of the genus *Listeria*. Their presence in wild fauna confirms the existence of sources of contamination in the environment and the risk of pathogen propagation in game species.

➤ The isolation of pathogens with zoonotic potential, from the red fox, from western Romania, highlights significant risks for public health or fauna and emphasizes the need to monitor and manage wildlife contamination.

➤ Based on the results obtained, we can state that other bacterial species with pathogenic potential, different from those isolated by us, can circulate in the red fox populations in Western Romania, for the isolation and identification of which we recommend further research, by using culture media special tests, as well as by performing serological and molecular biology tests on each animal.

➤ In most of the animals, from which samples were taken, bacterial strains with phenotypic and genotypic resistance to antimicrobial substances of clinical interest were isolated, an aspect demonstrated following the tests carried out by disc-diffusimetric methods, Vitek 2 Compact, and later by highlighting the resistance genotype by PCR analysis.

➤ A much greater diversity was found in the animals from the hunting funds whose area includes semi-urban, rural areas, running or standing water, as well as domestic animal farms, both in terms of the complexity of microorganisms with zoonotic potential identified, as well as the antibiotic resistance phenotypes shown by them.

➤ Although the costs of obtaining the data for the calculation of the Penetrance (%), respectively, the Odds Ratio (RC) indices are high, they provide important data on the antimicrobial efficiency of a medicinal preparation, respectively, they measure the effectiveness of a test used to determine phenotypic antibiotic resistance, the advantage being the fact that both indicators take into account both phenotypic and genotypic resistance.

➤ In Gram negative species, the highest rates of antibiotic resistance were recorded against amikacin (64%), tetracyclines (58%), gentamicin (57%), ciprofloxacin (56%), carbapenems (48%) and cephalosporins (ceftazidime 59%, cephalixin 48%).

➤ In Gram-positive species, the highest rates of antimicrobial resistance were recorded against penicillin (70%), clindamycin (67%), amoxicillin/clavulanic acid (53%), sulfamethoxazole/trimethoprim (53%), gentamicin (50%), cefoxitin (43%). Also, 12 strains of methicillin-resistant staphylococci were identified.

➤ The strains of *Enterococcus faecium* were resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim (100%), but also to tetracycline (91%), imipenem (82%), ciprofloxacin (73%), erythromycin and vancomycin (64%), with the mention that in ten strains the phenomenon of multiresistance to all

the antibiotics taken in the study was found. The results obtained with the Vitek 2 Compact equipment largely confirmed the resistance phenotypes identified by the disc-diffusimetric method.

➤ Insignificant differences were found, in terms of bacterial resistance, depending on the geographical area, a higher degree of resistance being found in isolates from foxes located in hunting grounds in areas more populated by people and influenced by human activities, aspect that highlights their impact on the spread of antibiotic resistance in the wild environment.

#### **IV. Originality aspects**

##### **Chapter 7. Originality aspects**

- It is the first larger research on the bacterial flora and antimicrobial resistance in the species isolated from the red fox (*Vulpes vulpes*), from hunting funds in Western Romania.

- Several species of Gram-negative bacteria were identified for the first time in our country, in the red fox from the hunting grounds in Western Romania, among which we especially mention *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Shigella sonnei* and *Proteus vulgaris*.

- Gram positive bacterial species were also identified for the first time in our country, among which we mention *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Enterococcus faecium*.

- The study was carried out on a large area, the samples being collected from a representative number of wild foxes, from 17 hunting funds, located in three counties in the west of the country.

- The research adopted an interdisciplinary approach that combines elements of special bacteriology, pharmacology, molecular biology and epidemiology.

- The study combined working techniques from classical microbiology, used to isolate, identify and test susceptibility to antimicrobial substances, with modern molecular genetics techniques to identify resistance genes.