



R.1.1.3 Anchetă retrospectivă privind rezistența microbiană la produsele antimicrobiene

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*
(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Coordonator:

Prof. Dr. Cristina T. Romeo

Întocmit de:

Drd. Moruzi Răzvan Florin

Drd. Diana Degi

Drd. Doma Alexandru

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - financed by project "*A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance*", in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

Data finalizării: 12.11.2020



CUPRINS

INTRODUCERE

IMPACTUL REZISTENȚEI LA ANTIMICROBIENE (R.A.M.)

CAPITOLUL 1.

ORIGINEA, MECANISMELE APARIȚIEI ȘI DE TRANSMITERII R.A.M.

CAPITOLUL 2.

RASPANDIREA IN TIMP A R.A.M. PRIN INTERMEDIUL ANIMALELOR

CAPITOLUL 3.

REZISTENȚA MICROORGANISMELOR LA DIFERITE PRODUSE ANTIMICROBIENE

CAPITOLUL 4.

PREZENȚA ȘI ACUMULAREA ANTIMICROBIENELOR IN MEDIU

CAPITOLUL 5.

ABORDAREA ONE-HEALTH ÎN CONTEXTUL R.A.M.

CAPITOLUL 6.

EVOLUȚIA CERCETĂRII R.A.M. IN MEDICINA VETERINARA

BIBLIOGRAFIE

R.1.1.3 Anchetă retrospectivă privind rezistența microbiană la produsele antimicrobiene

Întocmirea prezentului raport cu categoria de activitate *Cercetare fundamentală*, din cadrul **Proiectul 1**:

Consolidarea bazei de cunoștințe și a dovezilor prin supravegherea consumului și screening-ului sensibilității la produse antimicrobiene, a presupus o anchetare amănunțită a bibliografiei din domeniul Rezistenței la antimicrobiene (R.A.M.), de la începuturile acestui fenomen și până în prezent.

Plecând de la problemele și îngrijorările actuale în ceea ce privește RAM, s-a mers în trecut pentru o trecere în revistă a tuturor elementelor implicate, care au dus la situația de astăzi.

În timp, rezistența la antimicrobiene a devenit o problemă majoră, iar gravitatea acesteia este preconizată să se înrăutățească în viitorul apropiat. S-a dovedit că rezistența la antibioticele de origine animală contribuie semnificativ la rezistența globală la antibiotice, și în acord cu medicina umană și ținând cont de mediul înconjurător trebuie luate măsuri pentru a face față acestei situații alarmante.

Astfel, în ancheta retrospectivă privind rezistența la antimicrobiene, momentul de la care am încercat să privim în spate a fost cel în care impactul RAM este recunoscut la nivel global, cuprinzând o descriere succintă a celor mai importante evenimente, cercetări și discuții legate de apariția și răspândirea RAM, a tuturor microorganismelor cu rezistență dovedită la produsele antimicrobiene, precum și modul cum a evoluat cercetarea acestui fenomen în medicina veterinară și abordarea One-Health în ceea ce privește RAM.

IMPACTUL R.A.M.

De câteva decenii, rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă o amenințare tot mai mare pentru tratamentul eficient al unei game tot mai mari de infecții, cauzate de bacterii, paraziți, virusuri și fungi. RAM are ca rezultat o eficacitate redusă a produselor antibacteriene, antiparazitare, antivirale și antifungice, ceea ce face ca

tratamentul pacienților să fie dificil, costisitor sau chiar imposibil. Impactul asupra pacienților deosebit de vulnerabili este cel mai evident, rezultând în cronicizarea bolilor și mortalitate crescută (112).

Rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă capacitatea microorganismelor de a deveni rezistente la efectul substanțelor antimicrobiene (incluzând aici: antibioticele, medicamentele antivirale, antifungicele și antiprotozoaricele), la care, anterior, aceste microorganisme au fost sensibile (14, 15, 116).

De fapt RAM este consecința evoluției, a selecției naturale și a mutației genetice, această mutație prin transmitere conferind rezistență. Utilizarea pe scară largă a medicamentelor, și în special a antiinfecțioaselor, exercită o presiune semnificativă asupra microorganismelor și astfel amplifică viteza apariției și selecției de microorganisme rezistente în populațiile umane și animale (8, 30, 31).

Antimicrobienele reprezintă o categorie importantă de substanțe active folosite în profilaxia și tratamentul bolilor infecțioase, cu scopul de a păstra statutul de animale sănătoase și totodată productivitatea crescută (48). În ciuda acestor aspecte, utilizarea în cantități mari și pe scară largă a acestor substanțe a fost considerată factorul declanșator al emergenței, selecției și multiplicării microorganismelor antibioretistente, atât în medicina veterinară cât și în cea umană (43, 60, 79, 114).

Unul dintre primele avertismente cu privire la impactul clinic și societal al rezistenței la antibiotice a fost cel al lui Alexander Fleming în cadrul prelegerii sale Nobel „Penicilina” din 1945, după cum urmează:

„Poate să vină momentul în care penicilina poate fi cumpărată de oricine din magazine. Apoi, există pericolul ca omul ignorant să se supună ușor în doză și expunându-și microbii la cantități neletale de droguri să le facă rezistente. Iată o ilustrare ipotetică. Domnul X. are dureri în gât. Cumpără niște penicilină și o administrează, nu suficient pentru a ucide streptococii, ci suficient pentru a-i educa pentru a rezista penicilinei. Apoi își infectează soția. Doamna X primește pneumonie și este tratată cu penicilină. Deoarece streptococii sunt acum rezistenți la penicilină, tratamentul nu reușește. Doamna X moare. Cine este principalul responsabil pentru moartea doamnei X ?” (11).

Conform datelor de specialitate în Europa, un pui este tratat cu antibiotice de 2,3 ori pe parcursul scurtei sale existențe, iar un porc de 5,3 ori.

În ferme, administrarea constantă de antibiotice duce la achiziția și la amplificarea rezistenței bacteriilor la antibioticele folosite fără măsură. Transferate la om, în principal prin consum de carne, bacteriile rezistente vor împiedica eventualele tratamente cu antibiotice ale acestora (39, 107, 110).

În Germania se arată că peste jumătate din carnea de pui din supermarket-uri este contaminată cu bacterii rezistente la antibiotice. Mulți oameni nu pot nici măcar conștientiza că industria zootehnică se numără printre cei mai mari consumatori de antibiotice (41).

Conform unor studii, carnea de porc are cea mai mare concentrație de antibiotice. De asemenea, ele sunt prezente în concentrații mari în creveții și peștii de crescătorie. Chiar și unele legume organice sunt contaminate pentru că în jur de 75% dintre antibioticele utilizate pentru animale ajung în bălegarul folosit apoi ca îngrășământ în agricultură. Astfel, bacteriile sunt expuse la antibiotic în mod constant și devin rezistente la acestea. Conform unui raport ONU „*mediul natural devine un rezervor al reziduurilor de antibiotice, agenți patogeni rezistenți și alte molecule cu proprietăți antimicrobiene care sporesc răspândirea genelor rezistente în mediul microbial*” (115).

Amplarea și impactul RAM la nivel mondial pentru sănătatea umană, precum și asupra costurilor pentru sectorul asistenței medicale, dar și impactul social, sunt încă în mare parte necunoscute. Au fost încercate unele estimări ale efectelor economice ale RAM, iar constatările sunt: costul anual pentru sistemul de sănătate din SUA a fost estimat între 21 și 34 miliarde USD, cu peste 8 milioane de zile suplimentare de spitalizare (112).

Din datele EMEA și ale Comisiei Europene, rezistența la antimicrobiene este responsabilă, în UE, de 25.000 morți în fiecare an (35), costurile crescute pentru sistemul medical și scăderea productivității atingând cel puțin 1,5 miliarde de euro (100).

În India, infecțiile neonatale antibiotic-resistente sunt cauza decesului a aproximativ 60.000 de nou-născuți/an. Din 40.000.000 oameni/an care se tratează cu antibiotice pentru boli respiratorii, doar 13.000.000 au confirmată necesitatea prin examene de laborator.

Doar în SUA, mai mult de 2 milioane de infecții/an sunt urmarea rezistenței bacteriene la antibioticele de primă linie, tratamentele costând sistemul de sănătate

american cu 20 de miliarde de USD în plus, în fiecare an (77).

În lume se estimează că, în fiecare an, infecțiile rezistente la medicamente conduc la decesul a cel puțin 700.000 de pacienți (vezi fig. 1) și generează costuri de 1,5 miliarde euro / an numai în Uniunea Europeană. Prin urmare, fenomenul rezistenței a devenit una din prioritățile de la nivel european. Aproximativ 200.000 de oameni/an mor datorită tulpinilor de antibiotice multirezistente. RAM este o problemă care nu poate fi rezolvată de o singură țară sau regiune. Estimările privind costul acțiunilor privind RAM ajung la 40 de miliarde USD pe o perioadă de 10 ani (77).

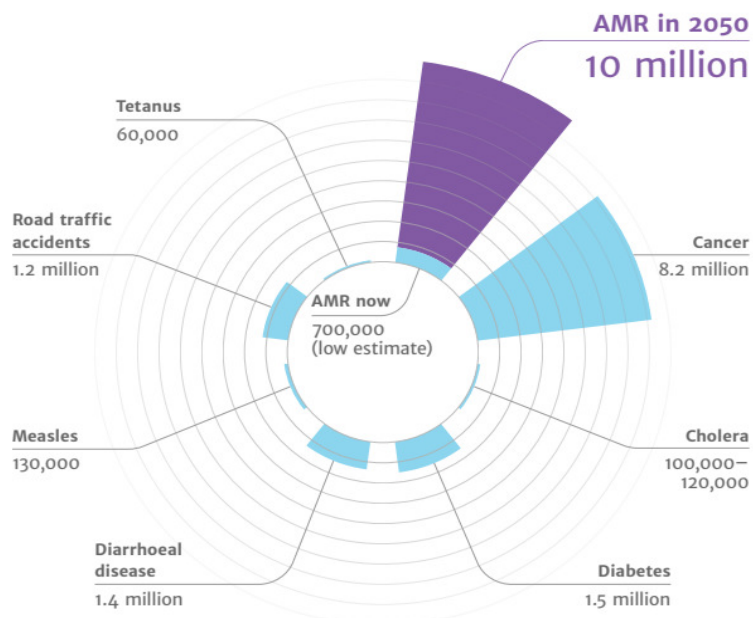


Figura 1. Impactul RAM în anul 2016 și în anul 2050 (77)

Se estimează că rezistența antimicrobiană la nivel global va ucide aproximativ 10 milioane de oameni anual, până în 2050, din cauza infecțiilor rezistente la antibiotice, din care doar în Africa cu aproximativ 4,15 milioane.

Acest lucru va costa economia globală aproximativ 100 de miliarde de dolari, cu aproximativ 28,3 milioane de persoane împinse spre sărăcie extremă. Rata alarmantă a RAM în țările în curs de dezvoltare poate fi atribuită utilizării greșite a antimicrobienelelor la om și animale (5, 20, 76, 77).

Citând surse ECDC și EMA, în Uniunea Europeană consecințele fenomenului de rezistență sunt dramatice, astfel:

- -tulpini multirezistente: aprox. 400.000 tulpini / an;



- -zile de spitalizare în plus: 2.500.000 zile spitalizare/an;
- -costuri de extra-spitalizare: 900 milioane euro/an;
- -pierderi de productivitate: 600 milioane euro/an,
- -anual, aproximativ 4 milioane pacienți dobândesc o infecție asociată asistenței medicale.

Rezistența la antibiotice poate avea și un impact economic asupra proprietarilor de animale. Dacă este ales tratamentul “sub orice formă, cu orice preț, efectele pot fi considerabile. De exemplu, Foster și col. tratamentul cu linezolid al unui câine cu bacteriemie MRSP și discospondilită. Pacientul a fost sub tratament o perioadă de 23 de săptămâni, iar judecând după dozele utilizate în raportarea de caz după prețurile din farmaciile suedeze, costurile pentru antibioticele utilizate au ajuns la 176.000 coroane suedeze, adică 25 600 dolari. De cele mai multe ori, un asemenea cost ar fi imposibil de acoperit de un număr foarte mare de proprietari (12).

În mod alarmant, incidența infecțiilor fungice invazive este în creștere, iar agenții patogeni rezistenți la medicamente se răspândesc pe tot globul. Rezistența antifungică reprezintă o provocare clinică majoră pentru clinicieni, în special în tratarea infecțiilor fungice invazive, din cauza arsenalului limitat de agenți antifungici sistemici disponibili. În plus, medicamentele actuale sunt limitate prin interacțiunile legate de medicament și efectele adverse / toxicitățile care împiedică utilizarea lor prelungită sau creșterea dozelor.

Rezistența la antifungice a devenit o preocupare semnificativă pentru medicina veterinară, rezistența la medicamentele antifungice disponibile în prezent se poate dezvolta secundar mecanismelor dobândite ca urmare a expunerii la aceste medicamente (21, 24, 108).

Statele membre UE pot reduce utilizarea antimicrobienulelor veterinare, cum este Suedia care are cea mai mică rată de consum de antimicrobiene veterinare din UE, deoarece s-a pus un accent pe sănătatea animală, bunăstarea și biosecuritatea fermelor, ceea ce a contribuit la acest lucru. Planurile de prevenire și control al infecțiilor sunt obligatorii pentru toate fermele, antimicrobienele sunt utilizate doar pe bază de rețetă, iar datele naționale privind utilizarea antimicrobienulelor veterinare au fost colectate de mulți ani (42).

În Olanda, Franța și în special Spania, utilizarea masivă a antimicrobienulelor de uz veterinar a fost ridicată. Utilizarea antimicrobienulelor atât în Franța, cât și în

Olanda, s-a înjumătățit între 2011 și 2016. Deși Spania a realizat și ea o scădere între 2014 și 2016, totuși a rămas unul dintre statele membre cu o utilizare foarte mare de antimicrobiene veterinare (42).

RAM este o provocare complexă pentru sistemul de sănătate publică globală, iar o strategie singulară, simplă, nu va fi suficientă pentru a stopa apariția și răspândirea microorganismelor care devin rezistente la medicamentele antimicrobiene disponibile. Lipsa de noi antimicrobiene la care să le înlocuiască pe cele care devin ineficiente, atrage atenția necesității de a proteja eficacitatea medicamentelor existente (112).

1. ORIGINEA, MECANISMELE DE APARIȚIE ȘI DE TRANSMITERE A R.A.M.

De mai bine de 60 de ani, produsele antibacteriene au fost considerate ca panaceu pentru vindecarea infecțiilor, indiferent dacă utilizarea lor este adecvată sau nu, și dacă infecția a fost dobândită în comunitate sau în spital (112).

Încă din discursul său din 1945, Alexander Fleming, care a descoperit penicilina, a avertizat după cum am prezentat și în partea introductivă, că bacteriile pot deveni rezistente la aceste remarcabile medicamente.

Într-adevăr, dezvoltarea fiecărui antibiotic nou, a fost urmată de detectarea rezistenței la acesta. Dezvoltarea rezistenței este un proces evolutiv normal pentru microorganisme, dar este accelerată de presiunea selectivă exercitată de utilizarea pe scară largă a medicamentelor antibacteriene. Tulpinile rezistente sunt capabile să se propage și să se răspândească acolo unde nu sunt respectate măsurile de prevenire și control al infecțiilor (112).

Utilizarea antibioticelor a devenit larg răspândită de-a lungul mai multor decenii (deși accesul echitabil la antibiotice este departe de a fi disponibil în întreaga lume), iar acestea au fost utilizate pe scară largă atât la oameni, cât și la animalele de fermă în moduri care favorizează selectarea și răspândirea bacteriilor rezistente.

În consecință, medicamentele antibacteriene au devenit mai puțin eficiente sau chiar ineficiente, rezultând o problemă globală de securitate a sănătății, care depășește rapid opțiunile disponibile de tratament (112).

Până în anul 1970, s-au dezvoltat multe antibiotice noi la care cei mai frecvenți agenți patogeni erau inițial complet sensibili, dar ultimele clase de antibiotice complet noi au fost descoperite în anii 1980 (vezi fig. 2).

De aceea este esențial să se păstreze eficacitatea medicamentelor existente, prin măsuri de minimizare a dezvoltării și răspândirii rezistenței, în timp ce eforturile de a dezvolta noi opțiuni de tratament continua (112).

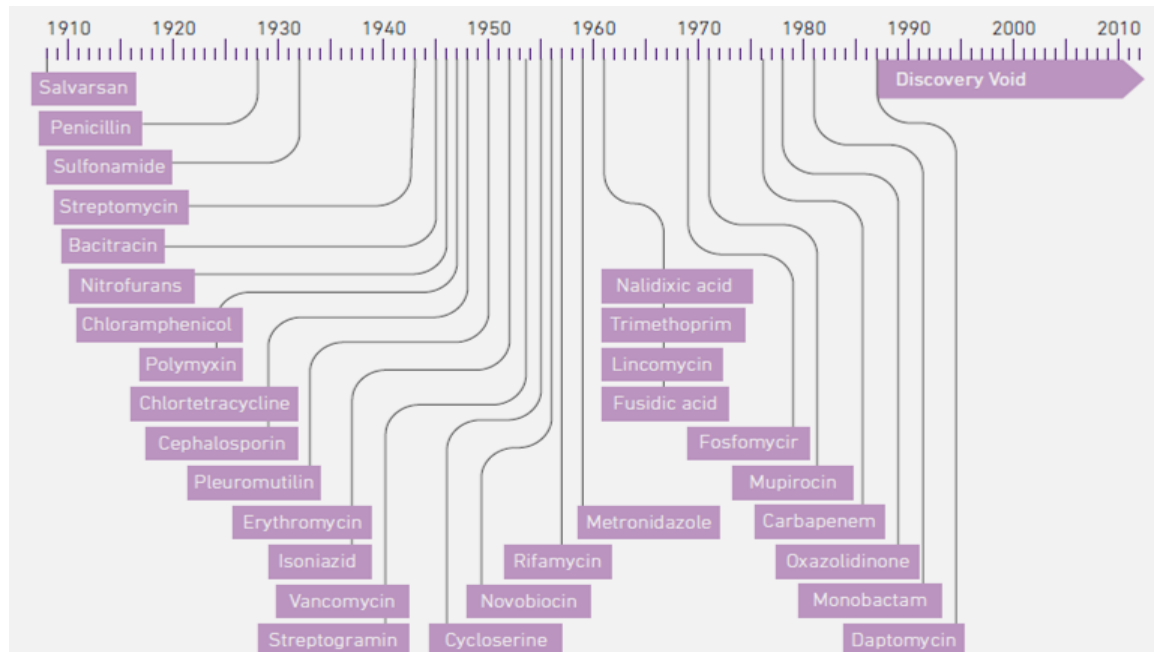


Figura 2. Datele descoperirii unor clase de antibiotice și perioada de „gol în descoperirea de noi structuri” (112)

Utilizarea medicamentelor antifungice în medicina umană și veterinară a crescut în ultimii ani (34). Nevoia de medicamente antifungice sigure și eficiente a devenit importantă, în special în medicina veterinară a animalelor de companie, o dată cu unele afecțiuni fungice sistemice precum și pentru a trata infecții cutanate cauzate de dermatofiți sau ciuperci (87).

Comparativ cu gama de medicamente cu activitate antibacteriană, clasele de medicamente antifungice disponibile sunt foarte limitate, astfel majoritatea tratamentelor sistemice la animale se fac cu substanțe din clasa azolilor. Tratamentul medicamentos antifungic este de multe ori mai îndelungat decât cel antibacterian. Unele dintre cauze pentru această diferență este că fungii cresc mai lent, dar totodată medicamentele utilizate (în special clasa azoli) au acțiune fungistatică și nu fungicidă, ceea ce conduce la necesitatea unui tratament de lungă durată pentru a

inhiba creșterea fungilor și pentru a permite sistemului imunitar al animalului (care adesea este compromis) să combată infecția (99).

În ultimii ani, descoperirea și introducerea pe piața farmaceutică a noi molecule antifungice au condus la o abordare mai sigură a tratamentului infecțiilor micotice. Clinicianului i s-au pus la dispoziție medicamente noi pentru prevenția și tratamentul infecțiilor fungice sistemice și superficiale, atât la animalele de companie, cât și la cele de rentă. Tratamentul este posibil astăzi chiar și la animalele imunosupresate (expuse la terapie antineoplazică, radioterapie, terapii prelungite cu corticosteroizi), cu risc crescut de a contracta o infecție fungică (65).

Până de curând, tratamentul micozelor sistemice la om a fost limitat la administrarea intravenoasă de amfotericină B și de ketoconazol oral. Cu toate acestea, în ultimele două decenii, au fost realizate progrese semnificative în dezvoltarea de medicamente antifungice cum ar fi: de prima generație de triazoli, a doua generație de triazoli și echinocandinele (47).

Mecanismele de apariție și de transmitere

Genomul bacterian este de aproximativ 1000 ori mai mic decât genomul animal și uman. Aceasta nu se datorează faptului că bacteriile sunt mai mici decât celulele umane, ci datorită concurenței și conceptului denumit „*raționalizarea genomului*” (33, 60).

Cei doi factori majori care guvernează rezistența la antimicrobiene sunt:

Utilizarea antibioticelor, care exercită o presiune ecologică asupra microorganismelor și contribuie la apariția și selecția de microorganisme rezistente la antimicrobiene în populații;

Răspândirea și transmiterea încrucișată a microorganismelor rezistente la antimicrobiene între oameni, între animale și între oameni și animale și mediu (120).

Instalarea rezistenței la antibiotice este stadială, cunoscând trei etape principale:

- a). O mutație genetică poate provoca rezistență la medicamente.
- b). Modul în care transferul genelor facilitează răspândirea rezistenței.
- c). Diferența dintre bacteriile non-rezistente și cele rezistente la medicamente.

Populația mare de bacterii este urmată de concurența intensă și funcționează pe principiul „*cel mai adaptat va supraviețui*”, populațiile de bacteriile mai slabe și mai ineficiente sunt rapid epuizate de populațiile de bacterii eficiente, În același timp,

există un nivel foarte ridicat al concurenței între bacterii pentru resurse. Se cunoaște că bacteriile cresc mult mai repede și într-un număr mult mai mare, decât majoritatea altor organisme. Într-un singur pumn de noroi sunt mai multe bacterii decât întreaga populație din lume (15, 16).

La bacterii, ADN-ul în exces în această competiție este considerat „balast” fiind rapid eliminate, în cazul în care o secvență a ADN-ului nu este esențială supraviețuirii sau nu conferă un avantaj selectiv, va fi rapid mutat și scos din genomul de evoluție al populației bacteriene. În timp, această evoluție face ca medicamentele să devină puțin eficiente, și în ultimă instanță, inutile (54).

Pentru ca o genă și/sau o parte din genomul bacteriilor să rămână funcțională pe o perioadă îndelungată, acesta trebuie să ajute la îmbunătățirea supraviețuirii și/sau competitivității bacteriilor. Dacă o genă încetează să mai fie de ajutor aceasta va deveni în cele din urmă nefuncțională și vor fi eliminate din genom (50).

Acest lucru înseamnă că dezvoltarea și întreținerea rezistenței la antibiotice este, de obicei, dependentă de populația bacteriană aceasta fiind expusă frecvent dozelor non -letale de antibiotice, desigur fără a uita că unele bacterii sunt rezistente natural la unele antibiotice (50). Acest proces va elimina acele bacterii care au pierdut rezistență, și crește procentul celor care au câștigat-o. În realitate, aceasta înseamnă că rezistența la antibiotice este posibil să apară în medii în care bacteriile sunt frecvent expuse la antibiotice (8, 19).

La nivel individual, aceasta înseamnă că o persoană poate dezvolta o infecție rezistentă la tratamentul cu antibiotice, urmare a tratamentului de durată sau profilactic, spre deosebire de tratamentele pe termen scurt cazul infecțiilor acute. Acest lucru poate însemna și că bacteriile își pot pierde rezistența la antibioticele care nu au fost utilizate frecvent (52). Fazele secundare de instalare a rezistențelor sunt transformarea, transducția și conjugarea, astfel (vezi Tabelul 1):

Transformarea apare atunci când fragmente de ADN libere, urmarea lizei unui organism, sunt preluate de către un alt organism. Gena rezistenței la antibiotice poate fi integrată în cromozom sau plasmida celulei destinatarului. Transducția este faza în care genele rezistenței la antibiotice sunt transferate de la o bacterie la alta prin intermediul bacteriofagilor și pot fi integrate în cromozomul celulei recipiente fenomen cunoscut sub denumirea de *lizogenie*.

Conjugarea este consecința contactului direct care are loc între două bacterii: plasmidele vor forma un pod de împerechere și ADN-ul este schimbat, situație care poate duce la dobândirea de gene rezistente la antibiotice de către celula destinatar (10, 15, 33, 48, 54).

Tabelul 1.

Căi de rezistență antimicrobiană și incidență (25)

Calea	Definiție	Incidență	Exemple
Primară: Mutație	Modificarea spontană a genomului	La o rată destul de mică	Chinolone (Salmonella serotypes) Rifampicină (Mycobacterium tuberculosis)
Secundară: Transformare	Captarea ADN-ului gol din mediu de către bacteriile acceptoare	Posibil subestimată	Streptococci Bacillus spp
Conjugare	Transferul de la bacteriile donatoare la bacteriile acceptoare printr-un tunel proteic Mediată de plasmide sau transpozoni	Frecventă	Enterobacteriaceae (ACSSuT- - resistance in Salmonella typhimurium DT104)
Transducție	Genele de rezistență sunt transferate de bacteriofagi	Rară	Staphylococci Pseudomonas spp.

Mecanismele de apariție a rezistenței se pot împărți în trei mari categorii:

a). Scăderea permeabilității: aceasta este cea mai comună formă de rezistență naturală. În aceste cazuri, antibioticul nu poate penetra suprafața bacteriei și deci nu poate ajunge la nucleul celulei. Permeabilitatea peretelui celular este determinată de natura acestora. Astfel în cazul bacteriilor Gram pozitive, de obicei acest perete nu este o barieră care să împiedice pătrunderea antibioticelor, cu toate acestea, în cazul Gram negativilor, acesta reprezintă o barieră greu de depășit și care variază în funcție de specia bacteriană.

De exemplu, peretele celulei este mari permeabil în cazul speciilor de *Neisseria* și *Haemophylus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* și a tulpinilor de *Proteus* indol-positive. În cazul lui *Escherichia coli* și a altor enterobacterii, proteina sa specifica (porina) va preveni patrunderea antibioticelor hidrofile cu o greutate moleculară de până la 650 daltoni.

Exemple de rezistență ale bacililor Gram negativi datorită scăderii permeabilității sunt în cazul penicilinei G, eritromicinei, clindamicinei și rezistența la vancomicină și rezistența streptococilor, a lui *Pseudomonas aeruginosa* și a altor bacterii anaerobe la aminoglicozide (1, 9, 23, 41, 50, 53).

b) Modificarea / inactivarea antibioticelor este mecanismul cel mai comun al rezistenței dobândite și este determinată în mare măsură de producția enzimelor betalactamaze. Betalactamazele reprezintă un grup de enzime produse de bacteriile Gram pozitive, Gram negative aerobe și anaerobe capabile să hidrolizeze inelului beta-lactamic și astfel să inactiveze antibioticul corespunzător. Acest mecanism specific a fost dovedit de mult a fi un factor important în rezistența germenilor ca *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis* și unele enterobacterii (1, 9, 41, 46, 53).

Informațiile genetice pentru sinteza acestor enzime pot fi conținute într-un cromozom sau pe o plasmidă și producția acestora poate fi o caracteristică de producție constantă a bacteriilor, deși pot fi induse și în prezența unui substrat corespunzător. Betalactamazele, pe baza profilului de substrat și a răspunsului la inhibitorii enzimatici sunt clasificate în cinci grupe mari. În practică, cele mai importante sunt grupurile I și III:

Grupa I lactamazică e produsă în cantități semnificative, în prezența antibioticelor, codificate de către genele cromozomului și distribuite între tulpinile *Enterobacteriaceae*. Aceste lactamaze sunt responsabile pentru rezistența tulpinilor Gram negative nozocomiale la cefalosporine.

Grupa III de enzime lactamazice sunt active asupra penicilinelor și cefalosporinelor și sunt aproape întotdeauna codificate plasmidic, acest grup include *TEM* betalactamaza prezentă în: enterobacterii, *H. influenzae* și *N. gonorrhoeae*. Printre bacteriile producătoare de beta-lactamază anaerobe este de remarcat *Bacteroides fragilis* care produce o cefalosporinază, inactivată de către acidul clavulanic. Sulbactamul și acidul clavulanic sunt capabile de a inhiba betalactamazele, în esență, cele mediate de plasmide atunci când sunt combinate cu anumite antibiotice, amoxicilina, ampicilina, ticarcilina și altele. Recent au fost identificate tulpini bacteriene betalactamazice care pot hidroliza noile betalactamine. În acest grup sunt incluse enzimele izolate din tulpinile plasmidice mediate de *K. pneumoniae* care au capacitatea de a hidroliza cefotaxina și alte cefalosporine din a treia generație, precum și aztreonamul și enzimele mediate de cromozomi prezente în tulpinile de *Pseudomonas maltophilia* precum și în *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* și *Bacteroides fragilis* capabile să hidrolizeze imipenemul și meropenemul (8, 10, 28, 48, 55, 117, 119).

c). Modificările locului de acțiune pentru antibiotice: Aceste mecanisme de rezistență se referă la modificările produse în structura sau etapele metabolismului pentru care medicamentele își exercită acțiunea. Aceasta se va realiza fie prin creșterea concentrației unei substanțe competitive, fie prin modificarea a diferite structuri alternative bacteriene.

d). Toleranța nu este considerată un mecanism clasic de rezistență în practică putându-se comporta ca atare. Ea este atribuită selecției de mutații deficitari în sisteme autolitice. Probabil că dozele mari concepute pentru a atinge niveluri mult peste CMI ale microorganismelor ar reduce selecția acestor subpopulații atunci când e necesară prelungirea duratei tratamentului.

Unele bacterii sunt rezistente în mod natural la anumite antibiotice (rezistență intrinsecă sau înăscută). O problemă și mai îngrijorătoare survine când unele bacterii, în mod normal sensibile la antibiotice, devin rezistente ca urmare a adaptării prin modificări genetice (rezistență dobândită) (120).

Rezistența antimicrobiană intrinsecă este o particularitate atât a microorganismelor patogene, cât și a celor nepatogene, deoarece este necesară pentru supraviețuirea și evoluția microbiană într-un mediu dinamic (78, 95, 98). Mecanismele majore ale rezistenței bacteriene intrinseci se bazează pe scăderea permeabilității celulei bacteriene pentru molecula de antimicrobian (prin proprietățile fizico-chimice ale moleculelor, prezența pompelor de eflux etc.), lipsa moleculelor țintă sau inactivarea antimicrobienelor prin mijloace enzimatică, vezi fig.3) (45, 78).

În ansamblu, acesta este rezultatul activității atât a elementelor genetice / ereditare, cât și a altor trăsături fenotipice implicate într-o gamă largă de funcții metabolice, care recent au fost considerate parte important pentru debutul și difuzarea R.A.M.

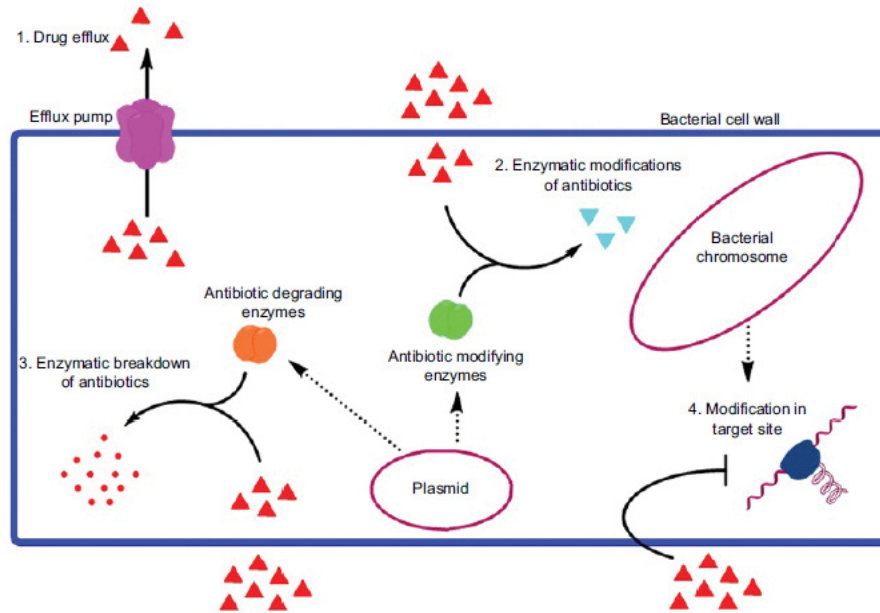


Figure 3. Mecanismele moleculare care determină RAM (13)

Rezistența naturală (adaptarea epigenetică) este o modificare fără mutație genetică, cea care duce la clarificarea spectrului antibacterian. De exemplu, penicilina este inactivă asupra bacteriilor Gram negative, acestea având o rezistență naturală la penicilină (42).

Bacteriile care se confruntă în mod constant cu niveluri sub-inhibitorii ale unui antibiotic. Acestea sunt concentrații care sunt prea mici pentru a ucide populația bacteriană, dar poate dezvolta o rezistență temporară la antibiotice. Acest tip de rezistență se numește *adaptare epigenetica*, și nu produce modificări genetice care pot fi permanent moștenite de generațiile ulterioare de bacterii (8, 46).

Aceasta poate fi echivalată cu un atlet care își „dezvolta musculatura” prin pregătire fizică. Tot așa și bacteriile expuse la niveluri sub-inhibitorii ale unui antibiotic pot mobiliza mijloace de apărare, cum ar fi pompele de expulzare a antibioticelor, enzime pentru a le descompune, sau se pot reduce pur și simplu prin permeabilitatea peretelui celular de a reduce expunerea lor la moleculele de antibiotice (50, 101).

După cum se poate observa în figura 4, antibioticele de obiceiucid bacteriile prin blocarea sau interferarea activității enzimelor necesare metabolismului lor propriu (poz.1). Bacteriile au „inventat” mecanismul *ply sly* „adaptarea vicleana” pentru a se sustrage de la atacul antibacterian (118).



Figura 4. Mecanisme de apărare ale bacteriilor în cazul atacului antibiotic (118).

Astfel bacteriile vor elimina enzimele proprii pentru a diminua efectul antibioticului (poz. 2).

Apoi acestea vor închide peretele celular pentru a preveni pătrunderea altor antibiotice (poz. 3) și vor pompa antibioticul în exterior înainte ca acesta să poată ucide (poz. 4), bacteriile mai pot modifica enzima vizată pentru a dezactiva medicamentul (poz. 5).

În acest mod bacteriile pot trece cu ușurință la cele mai utile instrumente proprii de supraviețuire și pentru alte invazii antibacteriene (118).

Rezistența câștigată apare la toate antimicrobienele, mai rapid sau mai lent. Acesta reprezintă și motivul pentru care unele antibiotice descoperite, sintetizate, extrase și cercetate terapeutic nu sunt introduse în terapeutică (31).

a. Adaptarea genetică (prin mutații genetice și selecție)

Numeroase surse, cel mai adesea, de origine exogenă determină apariția rezistenței. De exemplu radiațiile UV, pot provoca numeroase daune și modificări permanente ale ADN-ului.

Mutațiile genetice sunt defapt mici modificări ale codului genetic care apar la întâmplare în timpul replicării ADN-ului, sau ca rezultat al expunerii la radiațiile ionizante ca factori mutageni (ex. radiațiile) sau substanțele chimice (10).

Multe mutații genetice se petrec în porțiuni ale genomului care nu sunt esențiale pentru organism și care nu se modifică în mod semnificativ în funcționarea organismul. Atunci când o mutație apare într-un sistem important, aceasta este, de obicei foarte perturbator și slăbește organismul. Mutații care să îmbunătățească condiția fizică a unui organism sunt rare (106).

Unele antibiotice au ca țintă enzima bacteriana denumită ADN-giraza. Antibioticul se leagă de această enzimă, care împiedică replicarea ADN-ului bacterian. O mutație unică la o anumită poziție în această enzimă poate stopa efectul antibioticului și va permite bacteriilor să devină rezistente la antibiotic. Din această cauză numeroase antibiotice nu sunt recomandate pentru utilizarea pe termen lung,

parțial și din cauza creșterii probabilității ca unele bacterii să devină rezistente (26, 28, 31, 33, 38).

b. Achiziționarea genetică

Bacteriile pot dobândi bucați mari de ADN de la alte bacterii, virusuri sau din mediu. Este aproape imposibil pentru unele bacterii de a evolua la întâmplare și de a întâlni o gena sau o enzimă, care oferă o rezistență împotriva unui anumit antibiotic (cel puțin într-un interval de timp de săptămâni, luni și ani) (33, 48, 50).

Pentru adaptarea la un mediu în continuă schimbare, bacteriile folosesc flexibilitatea genomică pentru a se potrivi cât mai bine mediului înconjurător, incluzând, printre altele, capacitatea de a se proteja de substanțe toxice.

Mai mult, rezistența determinată genetic (adică ansamblul genelor implicate) creată de bacterii este transmisă eficient la expansiunea sa clonală și / sau la alte bacterii prin elemente genetice mobile, cum ar fi plasmidele, transpozonii și integronii (40).

Plasmidele

Sunt piese mobile a ADN-ului (adesea circulare) astfel bacteriile pot tranzacționa cu ușurință și și le pot dobândi din mediul, multe bacterii au plasmide multiple. Plasmide pot conține gene care inactivează un antibiotic (28, 48, 54).

Plasmidele R (ale rezistenței) reprezintă factori principali ai antibioretistenței extra-cromozomiale, fiind clasificate în: conjugative și neconjugative. Cele conjugative posedă 3 grupe de gene, respectiv *gene care*:

- *controlează transferul,*
- *codifică autoreplicarea și de rezistență față de unul sau mai multe antibiotice.*

Rezistența indusă de plasmide reprezintă cea mai mare parte a transmiterii rezistenței. Evaluarea recentă a stabilității genetice a plasmidelor împreună cu identificarea recurentă a plasmidelor de rezistență în izolatele naturale ale microorganismelor (în special bacterii) sugerează plasmidele ca un rezervor foarte important de gene RAM care pot fi propagate speciilor bacteriene fără efort și într-un mod eficient în timp (40).

Transpozonii sunt responsabili pentru flexibilitatea genomului microbian, în mare măsură. Sunt secțiuni de ADN care pot sări dintr-un loc în altul în codul genetic, sau chiar la codul genetic unui alt organism. Transpozonii sunt secvențe de ADN

care-și transportă propriile enzime de recombinare și care permit transpoziția de la o locație la alta, astfel pot transporta și genele rezistenței la antibiotice (28, 40, 48, 54)

Integronii sunt asociați cu mari beneficii pentru bacterii, oferind „instrumente” valoroase care permit supraviețuirea în medii extrem de variate. Printre gama de elemente genetice conținute în integroni, genele RAM s-au dovedit a fi de mare importanță, susținând supraviețuirea bacteriană la tratamente cu antibiotice. În mod similar cu celelalte elemente genetice mobile, integronii pot fi mobilizați atât de cromozomul bacterian, cât și de plasmide și pot fi propagate și integrate departe de locul lor original, conferind protecție antimicrobiană unui număr mare de microorganisme (40).

Bacteriofagii pot să copieze și să insereze în codul genetic, mai precis în genomul bacteriilor infectante (28, 48, 54).

Conjugarea apare în cazul în care există două bacterii care sunt direct adiacente una față de alta, crează o conexiune directă împărțind AND-ul (28, 48, 54).

Un alt sistem de elemente mobile mai puțin cunoscut utilizat de bacterii pentru transferul orizontal de gene este reprezentat de Elementele Integrative și Conjugative (ICE). Sistemul a fost descris relativ recent ca unul sau mai multe elemente integrative auto-transmisibile, capabile de mobilizare proprie pentru a transporta mai multe trăsături bacteriene, cum ar fi factorii de virulență, capacitatea de formare a biofilmului, rezistența la metalele grele și genele de rezistență la antibiotice (40).

Sistemele bacteriene de toxină-antitoxină (TAS) au fost, de asemenea, legate de rezistența la antibiotice. TAS este identificat în cea mai mare parte la speciile bacteriene supuse tratamentului cu antibiotice. Când este transportat într-o plasmidă, sistemul bacterian toxină-antitoxină reprezintă o cale verticală pentru transmiterea trăsăturilor de supraviețuire, dar poate fi prezent și în ADN-ul cromozomial și se crede că îndeplinește mai multe funcții celulare complexe, inclusiv RAM (40).

Naked DNA (ADN-ul liber) Bacteriile înglobează ADN-ul liber găsit în mediul înconjurător. Acest ADN poate fi de la bacterii moarte, sau o parte a unei structuri de biofilm (unele bacterii folosesc ADN-ul ca o structură pentru a se ancora într-o suprafață). Bacteriile pot utiliza tehnici pentru a obține ADN-ul și care le ajută să devină rezistente la un anumit tip și / sau clasă de antibiotice (28).

Altă modalitate de apariție a rezistenței este persistența fenotipică, care este condiția în care celulele bacteriene nu sunt ucise de doza / tipul de antibiotic administrat; în schimb, celulele se află într-o stare de repaus care este inversată odată cu eliminarea factorului de stres. Cu toate acestea, susceptibilitatea la antibiotice este revenită odată cu creșterea bacteriană și a doua expunere la antibiotice are ca rezultat efectul bactericid sau bacteriostatic.

Acest lucru se datorează faptului că rezistența la antibiotice nu este determinată de mutația genetică, iar genotipul celulei persistente este același cu „tipul sălbatic”. Prezența celulelor persistente în timpul infecțiilor are ca rezultat o eficacitate scăzută a tratamentelor pe bază de antibiotice.

Creșterea biofilmului bacterian a arătat că protejează celulele bacteriene împotriva tratamentului cu antibiotice. Aceasta are o semnificație relevantă din punct de vedere clinic în toate infecțiile cronice cu potențiala colonizare a suprafețelor (de exemplu, pacienți intubați, proteze, catetere) (40).

În prezent, rezistența la antimicrobiene (RAM) este concepută ca o caracteristică microbiană „modernă”, rezultată din expunerea prelungită și / sau necorespunzătoare a acestora la tratamentele cu antibiotice. Cu toate acestea, identificarea trăsăturilor de rezistență antimicrobiană în permafrostul antic, peșteri izolate și mumii, sunt martorii prezenței trăsăturilor antimicrobiene din timpuri îndepărtate, iar în prezent se folosește o distincție între RAM înnăscută și dobândită.

Prima este rezultatul unui proces evolutiv lent și lung pe care microorganismele l-au efectuat pentru a se adapta condițiilor de mediu, în timp ce al doilea este rezultatul unei adaptări „rapide” la o presiune selectivă bruscă, reprezentată de tratamentul antimicrobian (49, 81).

Cel mai adesea, acest proces de selecție este exacerbat de factorii umani (figura 5): utilizarea inadecvată a medicamentelor în medicina umană și veterinară, condițiile de igienă deficitară, practicile medicale curente greșite și erorile în cadrul lanțului alimentar.

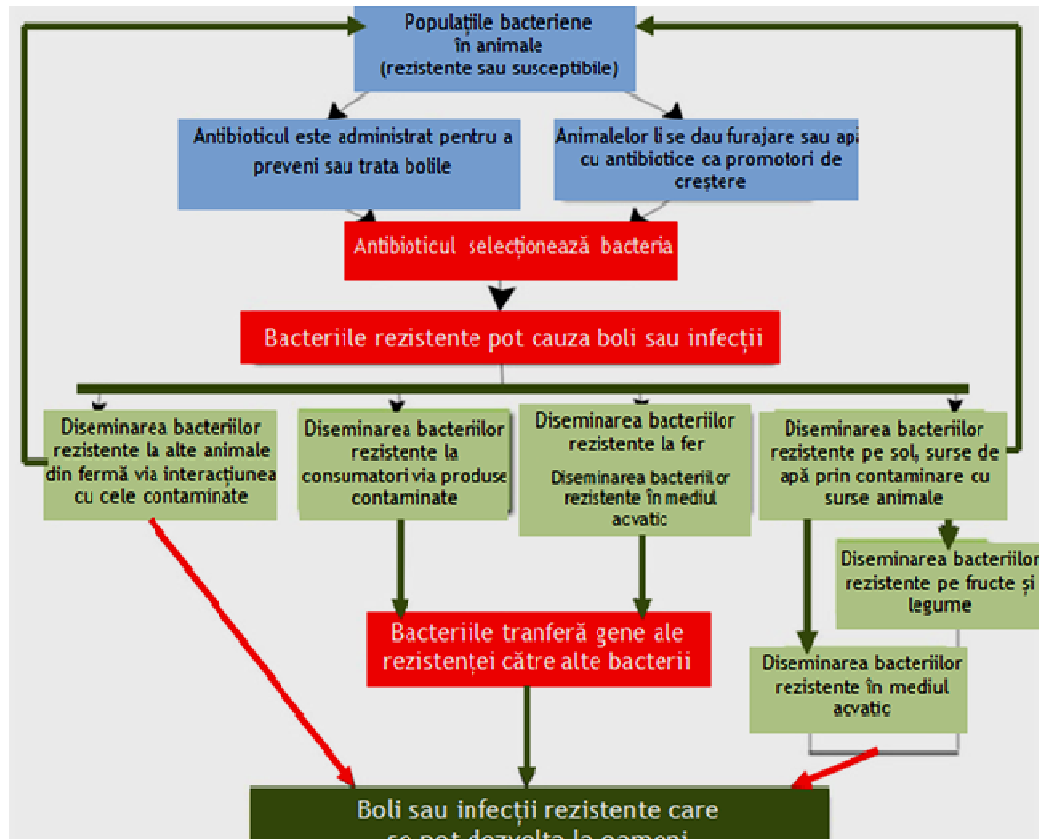


Figura 5. Principalele interacțiuni în mecanismul instalării rezistenței la anti-bacteriene (10, 60, 110) prelucrat Cristina 2018 (29).

Rezistența la medicamentele antifungice poate fi intrinsecă sau dobândită. Rezistența intrinsecă este o caracteristică moștenită a unei specii sau tulpini. În schimb, rezistența dobândită apare atunci când un izolat, sensibil anterior dezvoltă un fenotip rezistent ca urmare a unui tratament prelungit cu antifungice.

Mecanismul asociat cu rezistența dobândită depinde de modul de acțiune al clasei de medicamente antifungice și include absorbția redusă de medicamente, eliminarea de medicamente prin pompe de eflux sau afinitatea redusă a enzimelor țintă. Spre deosebire de celulele bacteriene, celulele fungice intacte nu preiau ușor ADN-ul exogen.

Drept urmare, rezistența la medicamente transferabile nu a fost descrisă printre taxonii fungici, iar răspândirea rezistenței a fost considerabil mai lentă decât cea observată la bacterii. Prevenirea apariției și răspândirii ciupercilor rezistente depinde de utilizarea tratamentului local mai degrabă decât cel sistemic (reducând astfel expunerea generală a florei fungice a animalului la agenții antifungici). În plus,

terapia antifungică combinată este o strategie bine recunoscută pentru prevenirea apariției rezistenței la flucitozină (51).

Rezistența la medicamente antifungice poate apărea prin diferite mecanisme ale agenților fungici. Acestea pot include: mutații în cadrul genei care codifică enzima țintă care duce la modificări în secvența de aminoacizi, exprimarea crescută a enzimei țintă prin transcrierea exagerată a genei pe care o codifică, concentrații reduse ale antifungicelor din celulele fungice din cauza efluxului medicamentos, modificări ale căii de biosinteză, ceea ce duce la scădere în producerea țintei medicamentelor antifungice (93).

Câinii sunt considerați a fi unele dintre potențialele rezervoare ale rezistenței antimicrobiene care poate fi transmisă la om prin contact direct sau indirect. Numărul de persoane care trăiesc cu animale de companie, în special câini, a crescut în întreaga lume în ultimele decenii (18).

2. RASPANDIREA IN TIMP A R.A.M. PRIN INTERMEDIUL ANIMALELOR

a. Prin intermediul animalelor de companie

În țările industrializate, populația de animale de companie a crescut în ultimele decenii, iar tendința este de creștere constantă. În consecință, rolul animalelor de companie s-a schimbat în timp, astfel că nivelul de atenție asupra stării de sănătate a animalelor și a condițiilor de igienă au dus la o îmbunătățire a bunăstării animalelor (88). Pe de altă parte, „contactul” crescut între animale și oameni a dus la un număr mai mare de infecții, și la transmiterea încrucișată a RAM. Astfel, potențialul zoonotic, împreună cu existența unor animale considerate rezervoare ale infecțiilor reprezintă în prezent o îngrijorare tot mai mare în ceea ce privește RAM (61, 71).

Rezistența antimicrobiană care are ca origine animalele de companie, reprezintă atât o amenințare directă cât și / sau indirectă asupra sănătății umane, și se referă în principal la *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), stafilococi rezistenți la meticilină, enterococi rezistenți la vancomicină, enterobacterii producătoare de carbapenemază și spectrul lărgit de bacterii gram-negative producătoare de beta- lactamază (ESBL) (83).

În anul 2003-2004, a fost efectuat un screening pe o perioadă de 24 de luni, pentru a determina frecvența *Staphylococcus spp* rezistent la meticilină, la animalele de companie. Studiul care s-a bazat pe 20.366 câini și 8.026 pisici, a evidențiat

prevalența alarmantă a rezistenței la meticilină, cu 40% din populația rezistentă identificată ca *Staphylococcus schleiferi*, 35% *S. aureus* și 17% *Staphylococcus intermedius*. Izolarea *S. schleiferi* a fost mai mai frecventă din dermatite și otite externe, mai ales la câini. Tulpina rezistentă de *S. intermedius* a fost izolată mai frecvent tot de la câini, în schimb MRSA a fost asociat cu infecții profunde, cu o frecvență similară la câini și pisici.

Testele de rezistență la alte clase de antibiotice, au indicat MRSA ca fiind rezistent la cele mai utilizate antimicrobiene, urmate de tulpina rezistentă de *S. intermedius*, în timp ce *S. schleiferi* a rezultat ca fiind cea mai susceptibilă (75).

Aceste observații au fost atribuite în principal tratamentelor antimicrobiene crescute la animalele de companie, indicând utilizarea excesivă a antibioticelor ca fiind cauza principală a apariției și difuziei RAM.

În prezent, sunt efectuate mai multe studii epidemiologice pentru a monitoriza prevalența și diseminarea RAM, dar acești parametri epidemiologici nu pot fi definiți în mod clar, deoarece sunt influențați de mai multe variabile, inclusiv caracteristicile populației, localizarea geografică și metodele de investigație utilizate pentru anchetă (83, 86). Doar un abuz de antibiotice nu este suficient pentru o transmitere atât de masivă a microorganismelor rezistente între oameni și animale de companie (64).

Se crede că o contribuție esențială la diseminarea RAM este cel mai probabil asigurată de mediu, ca vector care leagă mediul uman și animal (64). Se crede că monitorizarea speciilor nepatogene și capacitatea lor potențială de a dobândi trăsături de rezistență este o strategie promițătoare pentru a prezice (și preveni) viitoarele tulpini rezistente.

b. Prin intermediul animalelor de rentă

Potrivit Organizației Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO), în 2010 s-au produs 296 de milioane de tone de carne în întreaga lume. Aproximativ 23% din această cantitate a fost carne de vită sau de bivol, 37% carne de porc, 5% de capră sau oaie și 33% carne de pasăre.

Acvacultura a contribuit cu aproximativ 60 de milioane de tone de pește. În plus, au fost produse 69 de milioane de tone de ouă și peste 700 de milioane de tone de lapte. Consumul anual de carne este de aproximativ 80 kg / persoană în țările cu

venituri ridicate și de aproximativ 10 kg / persoană în țările cu venituri mici și medii (41).

Pentru a produce aceste mărfuri, stocul mondial de animale păstrate pentru producția de alimente în 2011 a totalizat aproximativ 1,6 miliarde de vite și bivoli, 2 miliarde de oi și capre, 1 miliard de porci și peste 20 de miliarde de păsări de curte, potrivit statisticilor FAO. Este de conceput faptul că animalele sunt crescute diferit, în funcție de specia de animale, regiunea geografică, legislația națională și intensitatea producției. Variaza de la producția la scară mică, cu câteva animale păstrate pentru consumul casnic, la scară largă în care mii de animale sunt crescute pentru producția de alimente destinate vânzării pe piața națională sau internațională (12).

De la descoperirea lor, antibioticele au oferit promisiunea de a trata și controla bolile infecțioase, declanșând o creștere masivă a utilizării acestora în toate domeniile aplicative, inclusiv în practicile obișnuite de creștere a animalelor (67, 104).

În mod tradițional, în creșterea animalelor s-au folosit antibiotice pentru tratamentul bolilor infecțioase, dar și pentru măsurile profilactice și ca promotori de creștere (36, 94). Aceasta din urmă se bazează pe observațiile ulterioare care leagă administrarea de doze subterapeutice de antibiotice cu o creștere semnificativă în greutate la animalele tratate (97).

Deși un mecanism clar pentru acest fenomen nu a fost încă pe deplin înțeles, s-a observat că o administrare prelungită de antibiotice la doze subterapeutice vizează mai multe organe și procese fiziologice rezultând (i) o biodiversitate redusă a microbiotei intestinale și o concurență redusă pentru substanțele nutritive, (ii) numărul redus de bacterii dăunătoare, (iii) stimularea redusă a sistemului imunitar, (iv) biosinteza crescută a vitaminelor la nivel intestinal și (v) modificarea metabolismului (7, 51).

În total, acestea au ca rezultat un echilibru energetic net îmbunătățit, astfel se obține o performanță mai bună a animalelor din punct de vedere zootehnic. Cu toate acestea, administrarea de antibiotice ca promotor de creștere nu poate distruge ireversibil bacteriile patogene (36). Mai mult, dozele subletale de antibiotice funcționează ca o presiune selectivă, stimulând capacitatea evolutivă bacterienă spre adaptarea la factorii de stres din mediul înconjurător și permiterea tulpinilor mai rezistente să supraviețuiască și să transmită trăsăturile RAM. Pentru a preveni



această problemă, Uniunea Europeană a adoptat interzicerea absolută a utilizării antibioticelor ca factori de creștere, din 2006.

Unele antibiotice nu mai sunt recomandate ca alegeri de primă linie din cauza rezistenței pe scară largă. Un exemplu este penicilina care a fost utilizată pentru a trata mastita cauzată de *Staphylococcus aureus* la bovine încă din anii 1950, dar astăzi rezistența este atât de frecventă la nivel regional încât penicilina nu mai este o primă alegere pentru această indicație.

De asemenea, apariția rezistenței la penicilină sau tetraciclină la *Pasteurella multocida* și *Mannheimia haemolytica* ce determină pneumonie la viței face îndoielnică utilizarea acestor antibiotice pentru tratamentul de primă linie în unele regiuni (16, 33).

Rezistența la *Escherichia coli* care provoacă enterită la porcii tineri a eliminat trimetoprim-sulfonamida ca primă alegere terapeutică relevantă (12).

Înlocuirea penicilinei, tetraciclinei și trimetoprim-sulfonamidelor cu fluorochinolone, cefalosporine de generația a treia și macrolide mai noi pot avea implicații pentru sănătatea publică. Aceste antibiotice sunt extrem de importante în îngrijirea sănătății umane, iar rezervoarele de bacterii rezistente la animalele păstrate pentru producția de alimente sunt nedorite (45, 50, 112).

Compușii antimicrobieni au fost și sunt administrați în mod obișnuit cu apa sau alimentele, asigurând o expunere prelungită a animalelor la doza mică de antibiotice pentru o perioadă lungă de timp. Cu toate acestea, efectele protectoare dispar odată cu oprirea administrării de antibiotice, iar animalele rămân susceptibile la infecții (36).

Administrarea profilactică a antibioticelor în creșterea bovinelor s-a realizat cu scopul prevenirii în principal a bolilor respiratorii și / sau abceselor hepatice (34, 85).

Mai mult, antibioticele cu spectru larg sunt administrate intramamar în perioada în care nu alăptează, pentru a preveni / reduce incidența mastitei (36).

Utilizarea antibioticelor în scopuri profilactice a fost practică și în industria porcinelor, fiind în general crescuți în grupuri echilibrate, în funcție de vârstă, dimensiune și greutate, facilitând tratamentul masiv cu antibiotice în special în perioadele cele mai sensibile. Astfel de perioade se întind de la naștere până la prima lactație, fiind perioade în care animalele sunt supuse unor practici stresante și cu potențial infecțios, cum ar fi tăierea cordonului ombilical, tăierea cozii și tăierea colților. Mai mult, perioadele de vaccinare și castrare sunt considerate sensibile,

astfel, administrarea de antibiotice cu spectru larg ajută la reducerea riscului general de infecție (40).

În mod ideal, intervențiile terapeutice sunt concepute în urma identificării exacte a agentului patogen și a testului său de susceptibilitate antimicrobiană (de exemplu, antibiogramă) (3, 4).

Cu toate acestea, o practică obișnuită o reprezintă extinderea tratamentului antimicrobian la întregul efectiv de animale, în încercarea de a limita răspândirea agentului patogen, rezultând o utilizare excesivă a antibioticelor, animalele neinfectate fiind și ele supuse tratamentului cu antibiotice (36).

Cele mai frecvente infecții în creșterea bovinelor sunt legate de febra de transport, pneumonia bovină și diareea de diferite etiologii, necesitând utilizarea masivă a antibioticelor obișnuite, cum ar fi penicilina, chinolonele, gentamicina și tilozina (69).

Mai mult, antibioticele cu spectru larg sunt administrate în mod obișnuit pentru tratamentul infecțiilor hepatice, în timp ce antibioticele cu spectru îngust, cum ar fi beta-lactamicele, sunt prima alegere pentru tratamentul mastitei de origine streptococică (22).

La nivel global, utilizarea terapeutică a antibioticelor în industria porcinelor este destul de redusă în comparație cu utilizarea antimicrobiană ca promotor de creștere sau în scopuri profilactice (32).

Cele mai frecvente infecții ale porcilor sunt legate de tractul gastro-intestinal și sunt asociate cu utilizarea extinsă a penicilinei, tetraciclinei, aminoglicozidelor și chinolonele. Mai mult, cantități mari de tiamulin, lincomicină și enrofloxacină sunt utilizate pentru tratamentul pneumoniei enzootice (40).

La păsările de curte, antibioticele folosite în scop terapeutic sunt în general furnizate cu apa potabilă, de obicei fiind utilizate penicilinele, aminoglicozidele, tetraciclinele, macrolidele și o combinație de sulfonamidă / trimetoprim (56, 66).

Clase similare de antibiotice sunt utilizate și în creșterea ovinelor și caprinelor (91). În prezent, cercetările efectuate au demonstrat de exemplu că enterococii, la păsări și mamifere, reprezintă cea mai mare rezervă de factori genetici transferabili ai rezistenței la antibiotice. Observațiile epidemiologice și moleculare recente au demonstrat că, rezistența la antibiotice în populațiile de animale poate amplifica cu certitudine problemele de din rândul populațiilor umane (1, 2, 9, 16, 37, 43, 62, 92)

Enterococii rezistenți la vancomicină (VRE) au devenit predominanți la animale și oameni acolo unde s-a folosit ca promotor de creștere avoparcinul (un glicopeptid), care structural este similar cu vancomicina, un antibiotic important în medicina umană și care este folosit adesea ca antibiotic de ultimă etapă. Ca o consecință, interzicerea utilizării avoparcinului la animale a fost urmată de un declin rapid al incidenței VRE în populațiile umane și animale. Cu toate acestea, prezența VRE în Europa nu a dispărut în totalitate (48, 52, 106).

Genele care codifică rezistența la antibioticele de uz veterinar, utilizate doar pentru animale, au fost izolate cu prevalență crescută în flora comensală la oameni, în patogenii zoonotice, cum ar fi de exemplu *Salmonella spp.*, dar și în patogeni strict umani, cum ar fi de exemplu *Shigella spp.* Acest lucru indică răspândirea clonală a tulpinilor rezistente precum și transferul comun al genelor rezistenței în rândul bacteriilor răspunzătoare de infectarea oamenilor și animalelor (16, 72).

Un alt exemplu clasic a fost legat de introducerea enrofloxacinii în medicina veterinară fapt care a fost urmată rapid de apariția rezistenței la fluorochinolone, (considerat un produs antiinfecțios revoluționar până la acea oră), printre izolatele de *Campylobacter spp.* prelevate de la puii de carne și *Campylobacter spp.* de la om, la scurt timp (55).

Rezistența la fluorochinolone la populațiile umane și animale a scăzut imediat în țările care nu au mai utilizat fluorochinolonele în hrana animalelor. Creșterea rezistenței la cefalosporinele de generația a treia, în cazul unor tulpini de *Salmonella spp.* și de *E. coli* a fost observată după utilizarea masivă a acestor antibiotice în creșterea păsărilor. Mai mult, retragerea și re-introducerea lor a fost urmată de un declin și respectiv de o renaștere a RAM la izolatele de *Salmonella* aviare și umane, demonstrându-se astfel fenomenul de rezistență (72, 73, 111, 114).

3. REZISTENȚA MICROORGANISMELOR LA DIFERITE STRUCTURI ANTIMICROBIENE

Următoarele paragrafe din acest capitol vizează descrierea principalelor specii bacteriene și fungice responsabile de infecțiile relevante ale animalelor domestice și contribuția lor la apariția și răspândirea RAM (vezi Tabelul 2).

Tabel 2.

Microorganismele majore responsabile de patologii infecțioase relevante și rezistența acestora la diferiți compuși antimicrobieni (40)

Bacteriile rezistente	Sursa de izolare	Compuși antimicrobieni	Mecanismul major de rezistență
<i>Campylobacter spp.</i>	Bovine Pui Curcan Porc Oaie Câine Pisică Cal	Chinolonele Macrolide Lincosamide Cloramfenicol Aminoglicozide Tetraciclină beta-lactami Cotrimoxazol Tilosină	Mutație punctuală a pompei de eflux multidrog CmeABC genă GyrA Metilarea țintei ribozomale Mutație punctuală în ținta ribozomală
<i>Salmonella spp.</i>	Om Pui Curcan Porc Pisică Câine Cal	Tetraciclina Sulfonamide Streptomicină Kanamicină Cloramfenicol beta-lactami Amoxicilină / acid clavulanic Acid nalidixic Ceftriaxonă	Mutații punctiforme multiple pe genele GyrA și GyrB, parC și parE gene AcrAB-TolC pompe de eflux multidrog. Modificarea proteinelor membranei externe gene qnr, care conțin plasmida Salmonella Pathogenicity Island-1 and -2
<i>Staphylococcus spp.</i>	Om Animale de fermă Câine Pisică Cal	Penicilină Meticilină Vancomicină	Staphylococcal Cassette Chromosome-mec genes (SCC-mec)
<i>Enterococcus spp.</i>	Om Animale de fermă	Vancomicină, Aminoglicozide Penicilină Cloramfenicol Eritromicina Tetraciclina	Isa gene
Alte gram-negative	Om Animale de fermă Animale de companie	beta-lactami	Lactamaze cu spectru extins

a. Bacterii - *Campylobacter spp.*

Campylobacter spp. este un grup de bacterii gram-negative, în formă de spirală, responsabile de infecții gastro-intestinale la animalele domestice, cum ar fi bovine, pui, curcan, porci, oi și animale de companie, inclusiv câini și pisici.

Agentul etiologic predominant este *Campylobacter jejuni*, dar la toate izolatele de *Campylobacter* s-a demonstrat rezistență împotriva unuia sau mai multor compuși antimicrobieni, inclusiv la chinolone, macrolide, lincosamide, cloramfenicol, aminoglicozide, tetraciclină, beta-lactami, cotrimoxazol și tilozină (40).

Modelele de rezistență observate la aceste exemplare sunt diverse și diferite în funcție de zona geografică și de sursa de izolare. O creștere accentuată a modelului de rezistență la fluorochinolona a fost înregistrată pe cele cinci continente, cu unele țări din Europa de Nord înregistrând o rată de izolare mai mare a *Campylobacter spp.*

de la păsări, rezistent la fluorochinolone, cel mai probabil datorită utilizării crescute a enrofloxacinii în industria păsărilor (40).

Rezistența la fluorochinolone a *Campylobacter spp.* se datorează în principal mutației la nivelul regiunii determinante a rezistenței la chinolone (QRDR) a ADN-girazei A.

Pe lângă mutația punctuală în regiunea de codificare a ADN-girazei A, rezistența apare și prin pompa de eflux multidrog, CmeABC, cele două cooperează sinergic pentru a spori rezistența prin reducerea compusului antimicrobian în celula bacteriană. În afară de fluorochinolone, s-a observat de asemenea o rezistență crescută împotriva macrolidelor, cu un număr mai crescut de izolate de *Campylobacter coli* rezistente la macrolide decât cele de *C. jejuni*.

Rezistența la macrolide se datorează metilării mediată de enzime sau mutației la nivel ribozomal. În plus, la fel ca rezistența la fluorochinolone, capacitățile de eflux sunt asociate cu o rezistență semnificativ crescută, sugerând o activitate sinergică între pompele de eflux și modificarea țintelor macrolidei (40).

Într-un studiu realizat în Marea Britanie publicat în Veterinary Antibiotic Resistance and Sales Surveillance Report - UK-VARSS în anul 2018, s-a studiat rezistența la antibiotice a bacteriilor zoonotice și comensale de la animale sănătoase la sacrificare, astfel s-a obținut (vezi fig. 6) (103):

- Rezistența *Salmonella spp.* la găini ouătoare, pui de carne și curci

Dintre antibioticele cu cea mai mare utilizare, nu s-a detectat nicio rezistență la cefalosporinele de generația a treia în izolatele de *Salmonella spp.* de la pui de carne, găini ouătoare sau curci în anii 2014, 2016 și 2018.

Rezistența la ciprofloxacina a fluctuat la un nivel scăzut de-a lungul anilor de monitorizare în izolatele de pui de carne, găini și curcani (rezistență de 2-9%), cu excepția izolatelor de curcan din 2014 (rezistență de 20%).

- Rezistența *Escherichia coli* la pui de carne și curci

Nu a existat rezistență la colistină în izolatele de *E. coli* de la curcani sau pui de carne în 2014, 2016 și 2018.

Rezistența la ciprofloxacina a avut o tendință descendentă la izolatelor de curcan între 2014 și 2018 (de la 8% la 3%) și a fluctuat la un nivel scăzut în aceeași perioadă la izolatele de la pui (între 2% și 4%). O rezistență scăzută la

cefalosporinele din generația a treia a fost detectată în izolate de la curcani și pui de carne în 2014, 2016 și 2018.

În 2018, 10,3% din probele din cecmum de la pui au avut *E. coli* cu un fenotip *ESBL* și / sau *AmpC*, iar pentru probele de cecum de la curcan a fost de 3,5%. Aceasta a realizat o scădere comparativ cu 2016, când aceasta a fost de 30,1% pentru puii de carne și de 4,7% pentru curcani. Nu s-au detectat *E. coli* producătoare de carbapenemază.

- Rezistența *Campylobacter jejuni* la puii de carne și curci

Rezistența la eritromicină, un antibioticde primă linie pentru infecția cu *Campylobacter* la oameni, a fost foarte scăzută în izolatele de pui de carne și curci (1%). Un nivel ridicat de rezistență la fluroquinolone a fost detectat în izolate de la pui de carne (între 41% -48%), în timp ce la curcani s-a observat o tendință de scădere (de la 35% în 2014 la 31% în 2018).

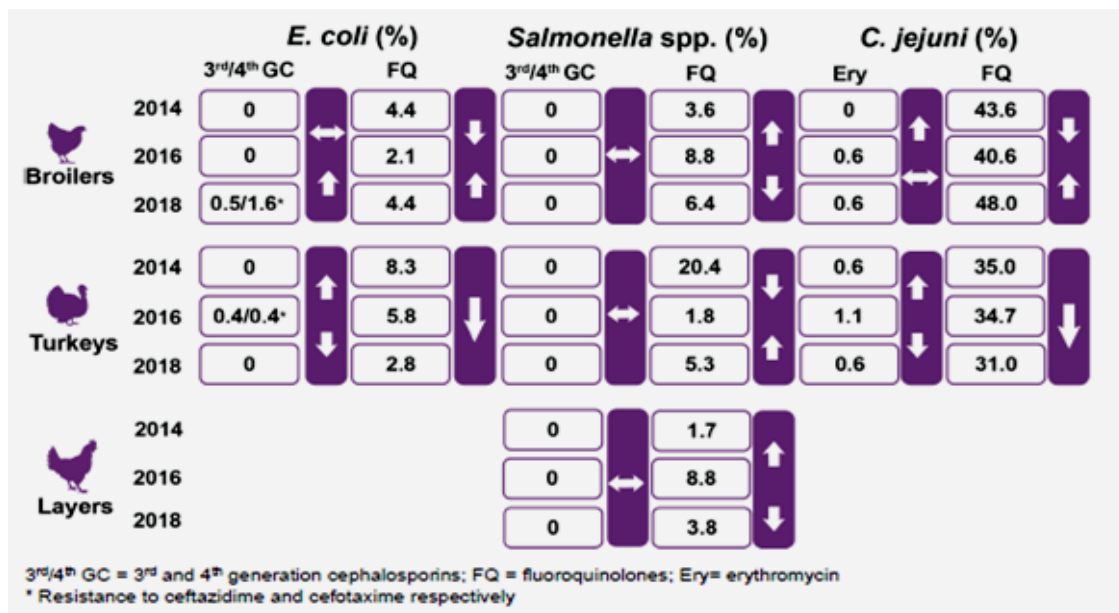


Figura 6. Rezistența la antibiotice a bacteriilor zoonotice și comensale de la animale sănătoase la sacrificare (103).

***Salmonella* spp.**

Sunt bacterii gram-negative care se găsesc frecvent în tractul gastro-intestinal al oamenilor și al animalelor. Tulpinile patogene determină infecții la o gamă largă de animale, păsări, porci, bovine, cai, pisici și câini, dar și la oameni (40).

Asocierea dintre utilizarea antibioticelor și apariția tulpinilor de *Salmonella* rezistente la antibiotice la nivelul fermelor, dar și consecințele acestora asupra sănătății umane, este investigată pe larg de o perioadă relativ îndelungată (40).

Astfel, s-a observat că *Salmonella* este rezistentă la diferiți agenți antimicrobieni, cum ar fi tetracilinele, sulfonamidele, streptomicina, kanamicina, cloramfenicolul și la unele dintre beta-lactamice.

Pe lângă clasele de antibiotice „tradiționale”, se remarcă faptul că se înregistrează o tendință în creștere de rezistență împotriva claselor „noi” sau a diferitelor combinații de clase de antibiotice, cum ar fi amoxicilină / acid clavulanic, acid nalidixic și ceftriaxonă.

Mecanismele de rezistență ale *Salmonella* spp. se bazează pe mutații la nivelul genomului care codifică țintele chinolonelor. Spre deosebire de *Campylobacter* spp. este necesară o multitudine de mutații punctuale pentru a obține un statut semnificativ de „rezistență”, mai multe regiuni țintă contribuind la apariția RAM: ADN giraza (genele GyrA și GyrB) și topoizomeraza IV (genele ParC și ParE) sunt țintele cele mai importante pentru obținerea rezistenței tulpinilor la fluorochinolone (40).

Alte mutații duc la supraexprimarea pompelor de eflux multidrog AcrAB-TolC, care de asemenea, au un rol esențial în rezistența *Salmonella* spp. Mai mult, modificările proteinelor membranei exterioare au, de asemenea, un rol în mecanismele RAM.

În plus față de așa-numitul fenotip clasic de rezistență la chinolone, s-a demonstrat la tulpinile de *Salmonella enterica* nontifoidale, prezența genotipului cu rezistență la chinolonă (qnr), unde o plasmidă care conține gene qnr conferă fenotipul de rezistență la chinolonă a *S. enterica*.

Acest lucru are ca rezultat supraviețuirea bacteriană chiar și la concentrații crescute de chinolonă și, prin urmare, tulpinile care poartă alele qnr sunt capabile să se multiplie și să transmit RAM în timpul tratamentului cu antibiotice.

Mai mult, prezența sistemică a *Salmonella* pathogenicity island-2 (SPI-2) or SPI-1 în țesuturile asociate intestinului permite supraviețuirea celulele persistente de *Salmonella*, care la rândul lor favorizează diseminarea pe termen lung a plasmidelor în rândul speciilor din intestin, rezultând o propagare a elementelor genetice ale RAM (40).

Într-un studiu clinic ce a presupus administrarea de cefalosporine și floroquinolone la pui, curcani, porci, bovine și ovine, s-a observat că un procent ridicat din toate izolatele de *Salmonella* testate (76% din 4.414 izolate totale) au fost susceptibile la toate antibioticele testate, rezultatele indicând o tendință de creștere a acestei susceptibilități (vezi fig. 7) (103).

Rezistența la cefalosporinele de generația a 3-a a fost detectată la două izolate de la pui, dar nu și în izolate de curcani, porci, bovine și ovine. Un izolat de la curcani și două izolate de la găini au prezentat rezistență la ciprofloxacină (fluoroquinolonă) (103).

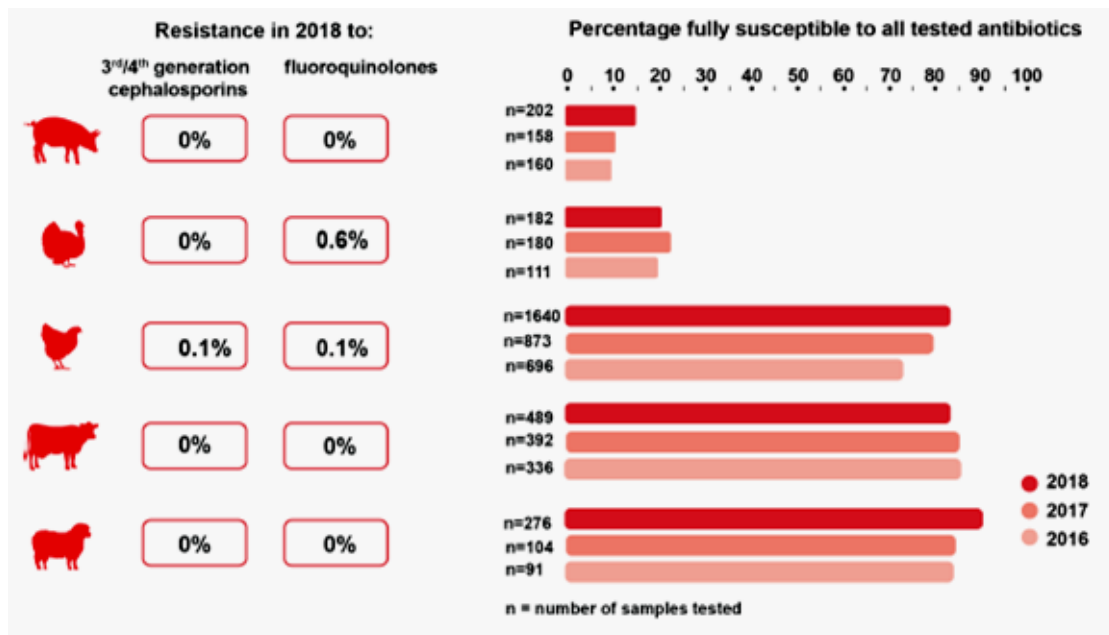


Figura 7. Rezistența *Salmonella spp.* la cefalosporine și floroquinolone (103)

Staphylococcus spp.

Sunt bacterii Gram-pozitive în formă de coci, care colonizează pielea și mucoasele. Deși majoritatea sunt comensale, unele tulpini bacteriene sunt responsabile de boli infecțioase importante la om și la animalele domestice (40).

Tulpinile de *S. aureus* rezistente la penicilină au fost izolate încă de la începutul anilor 1950, sugerând utilizarea masivă a antibioticelor în producția din domeniul zootehnic. Ipoteza inițială sugerează o posibilă origine umană a tulpinei, dar care a suferit o modificare în achiziția trăsăturii de rezistență la meticilină, indicând hrana porcină suplimentată cu antibiotice ca fiind cea mai plauzibilă cauză a RAM. Studiile ulterioare au respins această ipoteză, dovedind o apariție independentă a tulpinilor

patogene umane și animale. Până în prezent, doar tulpinile izolate de la animale și subproduse de origine animală au fost rezistente la meticilină. Mecanismele de rezistență se realizează prin achiziționarea staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec), conținând diferite gene mec, responsabile printre alte funcții și de rezistența antimicrobiană. Genele RAM sunt incluse în elementele genetice mobile și pot fi transmise în mod eficient către bacterii comensale, adăpostind aceleași nișe ecologice prin transfer orizontal de gene (40).

Enterococcus spp.

Sunt un grup heterogen de bacterii care se găsesc în mod obișnuit în microbiota intestinală a oamenilor și a animalelor de fermă. Tulpinile de enterococi sunt capabile să supraviețuiască condițiilor dificile de mediu, cum ar fi temperaturi extreme, condiții de pH diferite și mediu sărat. Mai mult, *Enterococcus spp.* izolate de la animale și produsele alimentare au prezentat rezistență la diferite antibiotice. Tulpinile de *Enterococcus* sunt intrinsec rezistente la vancomicină, aminoglicozide și penicilină (40).

Rezistența este mediată de gena *Isa*, chiar dacă detaliile moleculare sunt încă puțin înțelese, *Enterococcus spp.* sunt capabili să dobândească rapid trăsături RAM atunci când sunt tratați cu antimicrobiene. Introducerea în terapie a cloramfenicolului, eritromicinei și tetraciclinelor a fost rapid urmată de apariția tulpinilor rezistente de *Enterococcus*.

Cu toate acestea, *Enterococcus spp.* de origine animală și alimentară nu sunt concepute ca surse de risc directe pentru oameni. Acestea sunt considerate mai degrabă riscuri indirecte prin intermediul transmiterii RAM către tulpini adaptate la om, după cum s-a observat deja în cazul transmiterii rezistenței la vancomicină a *S. aureus* și la tetraciclină și eritromicină în cazul *Listeria monocytogenes* (40).

Pe lângă speciile bacteriene raportate mai sus, multe alte bacterii legate de contextul medicinei veterinare sunt considerate ca fiind responsabile de diseminarea RAM. Între acestea se numără și ansamblul heterogen de bacterii Gram negative care produc beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL), o caracteristică codificată cu plasmidă care conferă rezistență împotriva beta-lactamilor, cum ar fi cefalosporinele din a treia sau a patra generație și monobactamele.

Incidența *Escherichia coli* producătoare de ESBL la bovine, pui de carne și porc, este în continuă creștere, sugerând un potențial de diseminare a RAM prin intermediul lanțului animale-hrană-mediu (40).

Rezistența la *E. coli* se dezvoltă ușor, fie prin mutații, cum este cazul rezistenței la fluorochinolonă, fie prin achiziționarea de elemente genetice mobile, în cazul penicilinelor cu spectru larg (ampicilina sau amoxicilina) și rezistența la cefalosporinele de generația a treia.

Rezistența la cefalosporinele de generația a treia este conferită în principal de enzime cunoscute sub numele de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL), aceste enzime distrug beta-lactamicele. ESBL-urile sunt transmisibile între bacterii și chiar între speciile bacteriene. Deoarece tulpinile de *E. coli* care prezintă ESBL sunt, de asemenea, rezistente la mai multe medicamente antibacteriene, carbapenemele rămân de obicei singura opțiune de tratament disponibilă pentru infecțiile severe (112).

b. Fungi

Unele dintre cele mai întâlnite levuri în patologia zoonotică, sunt cele din genul *Malassezia*, recunoscute ca fiind parte componentă a florei microbiene a pielii omului și a animalelor. Speciile genului *Malassezia* habitează pe pielea omului și a multor vertebrate cu sânge cald, fiind agenții etiologici ai tulburărilor cronice și superficiale ale pielii (74,124)

Levurile din genul *Malassezia* sunt foarte susceptibile la itraconazol și posaconazol și mai puțin la fluconazol, indiferent de specie și de sursă. Toți derivații azolici, cu excepția fluconazolului, au prezentat o bună activitate antifungică *in vitro* împotriva *M. furfur* și *M. pachydermatis* (124).

Totuși, posibilitatea ca **M. pachydermatis** să dezvolte rezistență la antifungicele din clasa azoli a fost adesea indicată în literatura de specialitate pe baza testelor *in vitro*, de exemplu, studiul lui Nijima și col. (125), dar *in vivo* a fost raportat un singur caz de rezistență la câine. Un alt caz de rezistență *in vivo* la compuși azolici a *M. pachydermatis*, a fost o femelă de Poodle de 5 ani, diagnosticată cu dermatită și otită recurentă dată de *Malassezia*, tratată cu azoli sistemici și topici dar a cărei eficacitate a fost scăzută.

Concentrațiile minime inhibitorii (MIC) obținute *in vitro* pentru diferite antifungice din clasa azoli (în special itraconazol și ketoconazol) împotriva tulpinilor de

Malassezia izolate de la câine au crescut de câteva ori, comparativ cu MIC obținute de la izolatele de control. Aceste rezultate au întărit ipoteza bazată pe observația clinică, și anume dezvoltarea rezistenței la azoli (126).

Acest caz confirmă ceea ce sa raportat recent (127), și anume că rezistența la azoli poate fi cauza eșecului tratamentului la câini infectați cu Malassezia spp. Raportul precedent de rezistență (127) s-a referit la un câine de 15 ani, în Japonia, unde rezistența a fost suspectată din cauza lipsei de răspuns la tratament, care a constat în administrarea pe cale orală cu itraconazol (8 mg / kg) timp de 23 de zile și samponare săptămânală cu șampon ce conține miconazol 2%/clorhexidină 2% (126).

Într-un studiu retrospectiv, Beltaire și colab. au analizat tulpinile fungice izolate din uterul ecvin, colectate între 1999 și 2011 și au prezentat o rată de rezistență de 19% pentru itraconazol și 2% pentru fluconazol.

Cordeiro și col. au investigat 59 de izolate de **Candida tropicalis** obținute de la animale sănătoase și au găsit rezistență la fluconazol și / sau itraconazol în proporție de 50% din izolate, în timp ce toate izolatele erau susceptibile la caspofungină și amfotericină B.

Folosind același test de diluare ca în studiul precedent, Brillhante și colab au analizat izolate de Candida din canalul nazolacrimonial al cailor sănătoși și au constatat că 40% dintre izolatele de *C. tropicalis* erau rezistente la fluconazol și itraconazol. Același grup au găsit proporții ridicate de rezistență la fluconazol și itraconazol tot pentru izolate de Candida de la papagalul nimfă, iar mecanismul major de rezistență au fost pompele de eflux. A fost descrisă o rezistență dobândită a speciilor de *Candida tropicalis* multi rezistente în cazul infecțiilor urinare la câini (93, 128).

Într-un studiu care a implicat peste 140.000 de izolate de **Candida spp.** colectate pe o perioadă de 8,5 ani, rezistența totală la fluconazol și voriconazol a fost de 6,2%, respectiv 3,1%. Nivelul de rezistență pentru toate speciile de Candida a rămas relativ constant peste un deceniu.

În Olanda, rezistența la triazololi în rândul izolatelor a avut o prevalență anuală de la 1,7% la 6%, pe o perioadă de 14 ani. Echinocandinele (caspofungina, micafungina și anidulafungina) se extind în utilizare, deoarece sunt eficiente împotriva unei game largi de Candida spp., inclusiv asupra unor specii rezistente la azoli.

Studiile de supraveghere globală indică faptul că nu a existat nicio schimbare epidemiologică semnificativă în sensibilitatea la Candida spp. a echinocandinelor,

care sugerează faptul că deocamdată rezistența nu este o problemă majoră (129).

Rezistența azolilor a fost descrisă și pentru **Aspergillus**, dar până în prezent rar au fost raportate tulpini rezistente derivate de la animale. Infecțiile invazive cauzate de *A. fumigatus* rezistent la azoli sunt dificil de tratat din cauza lipsei de opțiuni terapeutice.

La om, pot fi utilizate formulări lipidice de amfotericină B, iar 5-flucitozină a fost recomandată la pacienții cu infecții ale sistemului nervos central cauzate de izolate rezistente. Cu toate acestea, ambele antifungice sunt limitate, prezintă toxicitate care poate interzice utilizarea lor pe termen lung, atât la oameni cât și la animale (130).

4. PREZENȚA ȘI ACUMULAREA ANTIMICROBIENELOR ÎN MEDIU

Un domeniu de interes este efectul pe termen lung al reziduurilor de antibiotice în mediul înconjurător. Deși utilizarea de către oameni a antimicrobienelelor poate fi o sursă primară de contaminare cu antibiotice a mediului acvatic și terestru, mult mai semnificative sunt tratamentele cu antibiotice în efectivele de animale, păsări și în acvacultură contribuind din plin la această problemă în creștere (41, 43, 58, 59).

Un procent variabil de antibiotice administrate omului și animalelor pot rămâne active în materia biologică excretată (în general, fecale sau urină) participând la contaminarea acvatică și terestră, cu antibiotice (59).

Antibioticele și metaboliții lor ajung mediu prin aplicarea gunoierului de grajd sau a fertilizării pe terenurile agricole, sau în mod direct la animale erbivore care pășunează. Acest lucru poate fi urmat adesea de scurgeri, deversări și pătrunderea în straturile mai profunde ale solului cu destinație agricolă. O parte din antibioticele care ajung în mediu rămân active biologic (58, 59)

Concentrații scăzute, subterapeutice, de antibiotic și care se acumulează în timp îndelungat poate avea efecte profunde asupra ecosistemelor. Concentrațiile de antibiotic acumulate în mediul extern vor exercita presiune selectivă asupra bacteriilor din mediu și poate favoriza, transferul genelor rezistente, contribuind la crearea „*rezistomului*” un amestec de trasaturi genetice ale rezistenței (46).

Prezența antibioticelor în sol

Concentrarea antibioticelor din diferitele straturi din sol se numește „*terracumulare*”. Terracumularea apare atunci când un antibiotic ajunge în sol la o rată care va depăși rata sa de degradare (46, 58)

Antibioticele administrate animalelor nu sunt complet absorbite de către acestea. În funcție de antibiotic, între 30 și 90% din antibiotic poate fi excretat prin urină sau fecale în stare bioactivă, chiar intacte sau sub formă de metaboliți antibiotici, care-și pot păstra mai departe activitatea antimicrobiană.

Așa cum se știe deja, rata excreției variază foarte mult fiind în funcție de farmacocinetica antimicrobienulelor administrate, calea de administrare, dar și de speciile de animale tratate (vezi fig. 8).

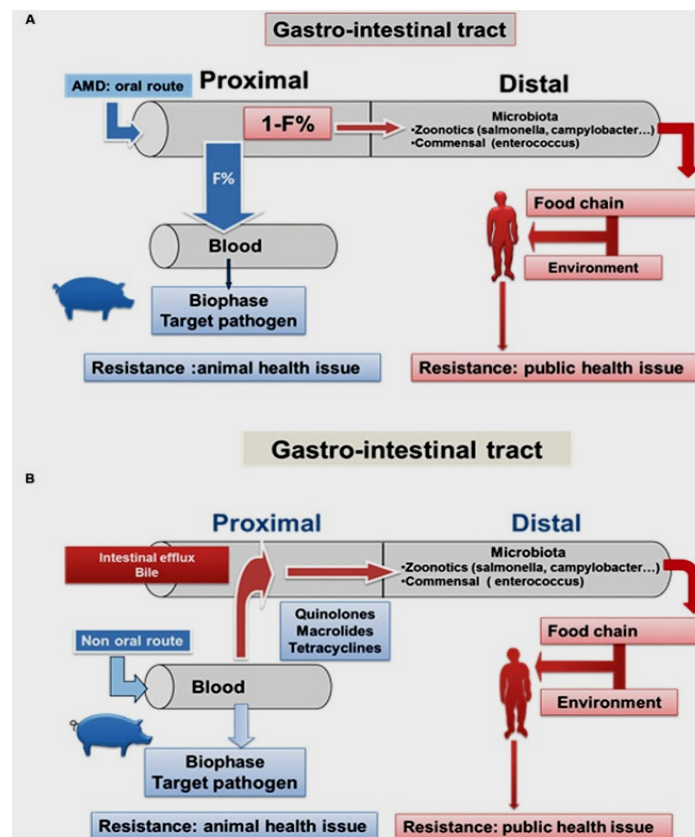


Figura 8. Impactul administrării antibioticelor (57).

După administrarea orală

Microbiota intestinală distală, care cuprinde agenți patogeni zoonotici și flora comensală este expusă la fracția de medicament neabsorbit în segmentul proximal digestiv, ceea ce crește presiunea selectivă locală și astfel crește densitatea bacteriilor și genele rezistenței.

Bacteriile rezistente și genele rezistenței sunt eliberate în mediu prin intermediul excreției fecale. Aceste organisme și genele pot ajunge la om, prin mai multe căi și în

cele din urmă vor avea acces la microbiota gastro-intestinală umană. Calea metabolică principală este lanțul alimentar (1, 54, 68)

După administrarea sistemică

Majoritatea medicamentelor de uz veterinar sunt eliminate în tractul gastro-intestinal, fie prin secreție biliară, fie prin clearance-ul intestinal, astfel apar concentrații ale farmaconului capabile să selecteze organisme rezistente (41, 63, 74).

Antibioticele administrate animalelor pot ajunge în sol și prin deșeurile medicale și medicamentele eliminate necorespunzător sau prin praful provenit din unitățile de creșterea industriale. Un număr tot mai mare de studii furnizează dovezi la nivel mondial ale prezenței multora dintre antibioticele veterinare în sol în concentrații care ajung chiar și la 9.990 μg/kgc, cel mai frecvent fiind identificate: oxitetraciclina, sulfametazina sulfaclopiridazina, și clortetraciclina (58).

Prezența antibioticelor în apă

Producția de acvacultură reprezintă aproape jumătate din peștele și produsele derivate din pește consumate la nivel mondial, ceea ce prezintă necesitatea de a trece la practici de producție intensivă și semi-intensivă (90).

În consecință, utilizarea antibioticelor atât în scop terapeutic, cât și în scop profilactic crește dramatic. Cele mai utilizate clase de antimicrobiene sunt sulfonamidele, penicilinele, chinolonele, tetracilinele și fenicolii, iar utilizarea lor extinsă este încă asociată cu o contribuție semnificativă la răspândirea generală a RAM între toate speciile de animale, inclusiv la oameni (6, 90).

Antibioticele care au fost identificate în sol și apele de suprafață au inclus cel mai adesea: macrolide, sulfonamide, tetracilină, cloramfenicol, clortetracilină, sulfametazină, lincomicine, trimetoprim, sulfadimetoxin și sulfametazina. Sulfametoxazolul este unul dintre compușii chimici cel mai frecvent detectați ca și contaminanți ai apelor uzate. O mare parte a contaminării acvatice cu antibiotice este datorată efluenților de spital și apelor uzate municipale (58, 68)

Până în prezent, nici un antibiotic nu a fost conceput special pentru utilizarea exclusivă în acvacultură, astfel, compușii antimicrobieni destinați altor sectoare ale medicinei umane și veterinare sunt utilizați în mod necorespunzător în contextul acvaculturii, sporind dramatic impactul apariției și răspândirii RAM (6, 90).

Șase dintre clasele de antibiotice enumerate de Organizația Mondială a

Sănătății (OMS) ca fiind extrem de importante pentru medicina umană (aminoglicozide, macrolide, peniciline, chinolone, sulfonamide și tetracicline) sunt utilizate în mod obișnuit atât în creșterea animalelor cât și în acvacultură, rezultând o contribuție enormă la eficacitatea redusă a acestor compuși în tratamentul infecțiilor relevante pentru om.

Mai mult, utilizarea inadecvată a antibioticelor este asociată cu o capacitate redusă a speciilor de pești de a metaboliza eficient medicamentele administrate. Astfel, reziduurile de antibiotice persistă o perioadă lungă de timp în carnea de pește, facilitând difuzia către ecosistemul terestru prin intermediul lanțului alimentar. În plus, s-a estimat că 70-80% din compușii activi sunt eliminați prin fecale care permit dispersarea antibioticelor prin apele uzate (40).

5. ABORDAREA ONE-HEALTH ÎN CONTEXTUL RAM

Fiind ubicvuitare, microorganismele reprezintă rezervoare de RAM în toate nișele ecologice. Rețeaua complexă de interacțiuni care apar între speciile microbiene din diverse „medii” facilitează fluxul genetic, extinzând RAM între oameni, animale și mediu (40).

Astfel, s-a dorit o abordare multisectorială coordonată, prin intermediul conceptului One-Health („**O singură sănătate**”) (vezi fig. 9), pentru a investiga și aborda acest fenomen. Acesta este definit ca: „efortul de colaborare a mai multor profesii din domeniul științei sănătății, împreună cu disciplinele și instituțiile conexe - care lucrează la nivel local, național și global - pentru a atinge o sănătate optimă pentru oameni, animale domestice, animale sălbatice, plante și mediu ” (69).

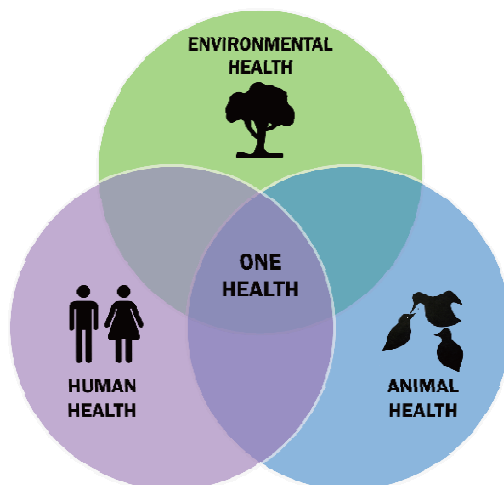


Figura 9. Principalele elemente ale conceptului „One Health / O singură sănătate” (121)

În anul 2003, în conexiune cu Ebola, William Karesh, spunea: “Sănătatea umană sau a animalelor domestice sau a faunei sălbatice nu mai poate fi discutată izolat. Există doar o sănătate. Și soluțiile necesită ca toată lumea să lucreze împreună la toate diferitele niveluri.”

În Statele Unite ale Americii, în anul 2007 Asociația Medicilor Americani (AMA) și Asociația Medicilor Veterinari Americani (AVMA) au convenit formarea comisiei “One Health Commission”. În anul 2008 Uniunea Europeană a promovat abordarea One Health și conceptul este integrat în anumite documente de strategie ale UE.

În anul 2009 se stabilește sediul One Health la nivelul Centers for disease control and prevention (CDC). În anul 2011 a fost organizat The First International One Health Congress, în Melbourne, Australia (123).

Într-o abordare atât de cuprinzătoare, utilizarea antimicrobiană (și utilizarea abuzivă) în sectoarele uman, animal și ecologic, împreună cu răspândirea la scară globală a mecanismelor de rezistență în interiorul și între aceste sectoare sunt identificate ca fiind principalele forțe motrice ale RAM (40).

Majoritatea claselor de antimicrobiene utilizate în tratamentul infecțiilor umane sunt folosite și în sectorul veterinar, rezultând o presiune selectivă cumulativă exercitată asupra microorganismelor, astfel rezultă o eficacitate redusă a tratamentelor antimicrobiene atât în domeniul uman, veterinar cât și al mediului (2).

În sectorul uman și veterinar, principalele acțiuni ale One-Health includ o prescriere judicioasă a antimicrobienei, prevenirea supra-prescripției și îmbunătățirea condițiilor de igienă și a planurilor de control al infecțiilor.

Acțiunile One-Health în ceea ce privește mediul includ tratarea adecvată a deșeurilor industriale, civile și agricole, în încercarea de a reduce diseminarea generală a RAM între sectoare. Abordarea One-Health în sectorul animalelor constă în evaluarea impactului relației dintre animalele de companie și om. Modul de influențare a acvaculturii asupra mediului, și și reducerea administrării în masă a medicației în efectivele de animale (69).

La nivel global organizațiile implicate în acest concept sunt: Organizația Mondială a Sănătății, Organizația pentru Alimentație și Agricultură și Organizația Mondială pentru Sănătate Animală. Aceste organizații împreună cu Programul Națiunilor Unite pentru Mediu trebuie să realizeze acțiuni comune pentru scăderea apariției și răspândirii RAM (122).

6. EVOLUȚIA CERCETĂRII RAM IN MEDICINA VETERINARA

Investigațiile inițiale asupra rezistenței au fost limitate la genele responsabile atât pentru toleranța directă, cât și indirectă împotriva substanțelor antimicrobiene, în special a celor folosite în practica clinică.

În prezent este bine stabilit că o abordare profundă care vizează mai multe niveluri ale macromoleculilor biologice (ADN, ARN, proteine și metaboliți) permite accesul la informații privind debutul, dezvoltarea și transferul mecanismelor de rezistență. O înțelegere a modului de comunicare între specii este de o importanță majoră pentru elucidarea modului în care factorii de mediu declanșează mecanismele de rezistență.

Atfel o varietate mare de nișe ecologice cu populații microbiana complexe fac obiectul studiilor care vizează rezistența, aceasta fiind investigată în gunoiul de grajd, sol, apă și produse alimentare provenite de la animale (81, 82, 96, 102, 113).

Metodele utilizate pentru investigarea RAM au evoluat de la abordarea tradițională bazată pe medii de cultură, la cele mai noi tehnologii omice (genomică, proteomică, metabolomică). Bazate pe o abordare holistică, științele omice și meta-omice reprezintă instrumente puternice pentru a investiga funcțiile și dinamica microorganismelor adăpostite în diferitele nișe ecologice (17).

Genomica este disciplina care studiază genomul microbian, elucidând funcțiile metabolice potențiale, oferind un set de date al tuturor genelor și elementelor genetice (de exemplu, plasmide și alte elemente genetice). Genomica are o influență esențială asupra celorlalte discipline omice, prin creșterea constantă a depozitului de secvențe de baze de date de folosite ca referință (40).

O secvențiere a întregului genom a fost recent utilizată într-un studiu privind Salmonella la păsări. Studiul indică faptul că 60% din izolatele de la păsările de curte au fost multirezistente, susținute de identificarea polimorfismelor cromozomiale cu nucleotidă unică (SNP) și identificarea diverselor elemente genetice mobile.

Mai mult, analiza secvenței raportează o nouă rezistență la streptomycină-azitromicină și o versiune necaracterizată a SGI1, confirmând industria păsărilor ca un rezervor de RAM care ar putea fi transmise altor tulpini bacteriene. Într-un studiu

similar, investigația genomică a ficatului de pui a indicat o predominanță ridicată (> 88% din izolatele testate) a *E. coli* multirezistente (40, 84).

O recentă investigație metagenomică efectuată asupra speciilor bacteriene din microbiota rumenului evidențiază o prevalență ridicată a genelor de rezistență la tetraciclină și includerea acestora în elemente noi integrative și conjugative (89).

Transcriptomica a fost utilizată în evaluarea comparativă a profilului de expresie al *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină, izolat din carne de porc.

Studiul evidențiază faptul că administrarea de doze subinhibitorii de produse antimicrobiene provoacă alterarea profilului transcripțional, astfel genele legate de transportul membranei, aminoacizii, carbohidrații și metabolismul energetic fiind exprimate diferențial (40).

Proteomica vizează ansamblul proteinelor exprimate de microorganisme, în momentul eșantionării. Împreună cu metabolomica, proteomica oferă imaginea cea mai realistă a efectorilor care mediază direct funcțiile metabolice operate de organisme, rezultând un instrument foarte puternic de monitorizare a metabolismului microorganismelor și modul în care compușii antimicrobieni declanșează adaptarea microbiană (105).

Investigația comparativă proteomică a fost utilizată pentru studierea membranei externe a tulpinii *E. coli* K-12 rezistente la kanamicină. Studiul descrie o expresie mai mare a proteinelor TolC, Tsx și OstA, în timp ce MipA, OmpA, FadL și OmpW au avut o expresie mai mică în tulpina rezistentă la kanamicină (44).

Metabolomica oferă un instantaneu al matricei de metaboliți produși de un anumit microorganism și / sau populație microbiană, permițând o investigație cuprinzătoare a metabolismului și evaluarea comparativă după tratamentul antimicrobian [167-169]. Deși are o importanță extremă, analiza datelor investigației metabolomice este destul de grea, limitând utilizarea acesteia ca instrument pentru confirmarea rezultatelor (40).

La bacteriile patogene, pentru animale și oameni genele care codifică rezistența la antibiotice au fost detectate prin tehnici de biologie moleculară, respectiv prin:

- *Polimerase Chain Reaction* (PCR),
- *Real-time* PCR.

Genele care codifică antibioretistența, în funcție de grupele de antibiotice, cu frecvența cea mai mare sunt genele:

- *mec A*, codifică rezistența la β lactamine, fiind prezentă la stafilococi coagulază pozitivi și negativi, dar și la alte bacterii;
- *amp C*, prezentă la *Enterobacteriaceae*;
- *pbp 5* prezentă la *E. foecium*, codifică rezistența față de peniciline;
- *tet*, codifică rezistența față de tetraciline;
- *gyr A*, *gyr B*, *par A*, *par E*, *grl A* și *grl B*, codifică rezistența față de fluorquinolone;
- *cat*, *cml A*, *cml A1* și *flo R* codifică rezistența față de grupa cloramfenicolilor;
- *enu*, *mef*, *msr*, *vgo*, *mph A*, *mph B*, *vot B*, *vot C*, *sot A*, *sot G*, *ere A* și *ere B* codifică rezistența față de macrolide și lincosamide;
- *asa C*, *aph*, *ant* și *la* codifică rezistența de aminoglicozide;
- *fol P*, *sul 1*, *sul 2* și *sul 3* codifică rezistența față de sulfamide (28).

Pe site-ul CARD – The Comprehensive Antibiotic Resistance Database identificabil la: <https://card.mcmaster.ca/> sunt prezentate principalele mecanisme ale rezistenței antiinfecțioase / clase și pe determinanții genetici ai rezistenței / genuri bacteriene.

În prezent sunt utilizate sau sunt în dezvoltare mai multe strategii pentru a găsi noi compuși antibacterieni. Nu numai că există o problemă în găsirea de noi antibiotice pentru a lupta împotriva bolilor vechi (din cauza tulpinilor rezistente de bacterii apărute), dar mai există o problemă, în a găsi noi antibiotice pentru a lupta împotriva bolilor noi.

În general cercetările din domeniu prezintă antibioerezistența ca pe un fenomen de urgență strâns legat de utilizarea clinică (sau de altă natură) a agenților antimicrobieni împotriva căruia s-a dezvoltat această rezistență (52, 53).

BIBLIOGRAFIE

1. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. 2001. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrob Ag Chemother.* 45(7):2054-2059.
2. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P (2008). Resistance in bacteria of the food chain epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(5):733-750.
3. Aarestrup, F.M. Other Pathogens. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*; ASM Press: Washington, DC , USA, 2019.
4. Aarestrup, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 96, 271–281. [CrossRef]
5. Adeyi OO, Baris E, Jonas OB, Irwin A, Berthe FC, Le G, et al. *Drug-Resistant Infections: A Threat To Our Economic Future. Vol. 2: Final Report*
6. Aich, N.; Ahmed, N.; Paul, A. Issues of Antibiotic Resistance in Aquaculture Industry and Its Way Forward. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018, 7, 26–41. [CrossRef]
7. Alexander, T.W.; Yanke, L.J.; Topp, E.; Olson, M.E.; Read, R.R.; Morck, D.W.; McAllister, T.A. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 4405–4416. [CrossRef] [PubMed]
8. American Veterinary Medical Association (AVMA) (2005). *Judicious Therapeutic Use of Antimicrobials.* Disponibil la: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Judicious-Therapeutic-Use-of-Antimicrobials.aspx>
9. Angulo FJ, Nunnery JA, Bair HD (2004). Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Rev Sci tech Off Int Epiz.* 23(2):485-496.
10. Antimicrobial Resistance Learning Site. The Human Health Impact of Antimicrobial Resistance In Animal Populations <http://amrls.cvm.msu.edu/veterinary-public-health-module/ii.-the-human-health-impact-of-antimicrobial-resistance-in-animal-populations>
11. Barriere S.L., 2014, Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance, 151- 153, *PharmD.*
12. Bengtson B., Greko C., 2014, Antibiotic resistance--consequences for animal health, welfare, and food production, *Ups J Med Sci*, 119(2):96-102. doi: 10.3109/03009734.2014.901445.
13. Bilal A., Wei W., Muhammad I., Mohsin K., Saima M., Muhammad H., Muhammad A., Ruman F., Muhammad A., Muhammad U., Muhammad K., Zulqarnain B., 2018, Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis *Infection and Drug Resistance* 2018:11 1645–1658
14. Bîlbîe V, Pozsgî N (1985). *Bacteriologie medicală, Vol. II, Ed. Medicală, București;*
15. Boerlin P and White DG (2006). *Antimicrobial Resistance and its Epidemiology. Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine 4th edn S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, Eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA.*
16. Bogaard AE, Stobberingh EE (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Ag*, 14:237-335
17. Boja, E.S.; Kinsinger, C.R.; Rodriguez, H.; Srinivas, P. Integration of omics sciences to advance biology and medicine. *Clin. Proteom.* 2014, 11, 45. [CrossRef]
18. Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., 2019, Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis, *Epidemiology & Infection*, vol.4, Cambridge core.
19. Bowman HHM. 1947. Antibiosis. *Ohio J Sci.*, 47(5):177-191.
20. Byarugaba DK. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk

- factors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004;24:105-110
21. Byrnes E.J., Bartlett H.K., Perfect J.R., Heitman J., 2011, *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals, *Microbes and Infection*, Volume 13, Issue 11, Pages 895-907
 22. Cameron, A.; McAllister, T.A. Antimicrobial usage and resistance in beef production. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2016, 7, 68. [CrossRef] [PubMed]
 23. Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties, *Clin Microbiol Rev*, 19(1):50-62.
 24. Case T.N., Heitman J., Cowen L., 2020, *The Rise of Fungi: A Report on the CIFAR Program Fungal Kingdom: Threats & Opportunities Inaugural Meeting*, *Genes-Genomes-Genetics*, Volume 10, 1837-1842.
 25. CATRY B., H. LAEVENS, L.A. DEVRIESE, G. OPSOMER, A. DE KRUIF, 2003, Antimicrobial resistance in livestock, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 26, 81–93,
 26. Chopra I, Roberts M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 65(2):232-260
 27. Corneli, O., Călin, M., 2016, *Antibiotice antifungice: clasificare, mecanisme de acțiune și mecanisme de rezistență*, Ed. MEDICHUB MEDIA, București
 28. Cristina RT (2006). *Introducere în farmacologia și terapia veterinară*, Ed. Solness, Timișoara.
 29. Cristina RT (2016). *Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale – Cursurile SNEC 2016*. http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
 30. Cristina RT (2018). *Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS, 06.06.2018*. <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf>
 31. Cristina RT, Chiurciu V (2010). *Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară*, Ed. Brumar Timisoara
 32. Cromwell, G.L. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.* 2002, 13, 7–27.[CrossRef] [PubMed]
 33. Dall' Acqua CS, Fedullo JD, Corrêa SH (2006). Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids, *Medical Mycology*, 44(4):383-387.
 34. Doster, E.; Rovira, P.; Noyes, N.R.; Burgess, B.A.; Yang, X.; Weinroth, M.D.; Lakin, S.M.; Dean, C.J.; Linke, L.; Magnuson, R.; et al. Investigating Effects of Tulathromycin Metaphylaxis on the Fecal Resistome and Microbiome of Commercial Feedlot Cattle Early in the Feeding Period. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1715. [CrossRef] [PubMed]
 35. ECDC (2010). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
 36. Economou, V.; Gousia, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 2015, 8, 49–61. [CrossRef]
 37. EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 - The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
 38. EMEA/CVMP/SAGAM/62464/2009 - Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and foods EFSA-Q-2009-00612 301, 1-10 /. Disponibil la: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500004306.pdf
 39. EPRUMA 2018 - Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics_%20EPRUMA_FINAL%20.pdf
 40. Ernesto Palma, Bruno Tilocca, Paola Roncada, 2020, *Antimicrobial Resistance in Veterinary*

- Medicine:An Overview, International Journal of Molecular Sciences
41. European Food Safety Authority (EFSA) (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016 The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J*;16(2):5182
 42. European Union, 2019., Addressing antimicrobial resistance: progress in the animal sector, but this health threat remains a challenge for the EU, nr. 21 – Special report
 43. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*, 18:646–655.
 44. Feng Zhang, D.; Li, H.; Min Lin, X.; Xian Peng, X. Outer membrane proteomics of kanamycin-resistant *Escherichia coli* identified MipA as a novel antibiotic resistance-related protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015, 362, fnv074. [CrossRef] [PubMed]
 45. Fernández, L.; Hancock, R.E. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and e_{ux} pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, 4, 661–681. [CrossRef]
 46. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (1998). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed. Mosby Inc., USA.
 47. Foy, D.S., Trepanier, L.A., 2010, Antifungal Treatment of Small Animal Veterinary Patients, *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*,40(6):1171-88
 48. Ghosh S, LaPara TM (2007). The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J*, 1:191-203.
 49. Giedraitiene, A.; Vitkauskienė, A.; Naginiene, R.; Pavilionis, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina* **2011**, 47, 137–146. [CrossRef]
 50. Giguère S. (2006). *Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction*. Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine 4th edn , S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, Eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA.
 51. Giguere S., Prescott J.F., Dowling P., 2013, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition*, Ed. Wiley Blackwell
 52. Gootz TD (2006). The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem Pharmacol*, 71:1073-1084.
 53. Gootz TD. (1990). Discovery and Development of New Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 3(1)13-31.
 54. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*, 368:874–885.
 55. Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ, Tauze RV, Rossiter Sp, Friedman CR, Joyce KW, Smith KE, Jones TF, Hawkins MA, Shiferaw B, Beebe JL, Vugia DJ, Rabatsky T, Benson JA, Root TP, Angulo FJ (2004). Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains in United States - 1997-2001. *Emerg Infect Dis*, 10(6):1102-1109.
 56. Gyles, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.* 2008, 9, 149–158. [CrossRef]
 57. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n1/fig_tab/nrmicro1325_F2.html
 58. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) (2017) Report European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA) Approved: 28 June 2017 *EFSA J*;15(7):4872, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4872
 59. Karçı A, Balcioğlu IA (2009). Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Sci Tot Environ*, 407:4652-4664;
 60. Kemper N (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Ind*, 8:1-13.
 61. Klous, G.; Huss, A.; Heederik, D.J.J.; Coutinho, R.A. Human-livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. *One Health*

- 2016, 2, 65–76. [CrossRef]
62. Lefebvre SL, Waltner-Toews D, Peregrine AS, Reid-Smith R, Hodge L, Arroyo LG, Weese JS (2006). Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control, *J Hosp Infect*, 62(4):458-466.
 63. Lista O.I.E a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf
 64. Loeffler, A.; Lloyd, D.H. Companion animals: A reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol. Infect.* 2010, 138, 595–605. [CrossRef] [PubMed]
 65. Mareș, M., Năstasă, V., Moraru, R., 2013, *Terapia antifungică în medicina veterinară*, Ed. PIM, Iași
 66. Marshall, B.M.; Levy, S.B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, 24, 718–733. [CrossRef]
 67. Marston, H.D.; Dixon, D.M.; Knisely, J.M.; Palmore, T.N.; Fauci, A.S. Antimicrobial resistance. *JAMA* 2016, 316, 1193–1204. [CrossRef]
 68. Martinez JL (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Poll*, 157:2893-2902.
 69. McEwen, S.A.; Collignon, P.J. Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Antimicrob. Resist. Bact. Livest. Companion Anim.* 2018, 6, 521–547.
 70. McEwen, S.A.; Fedorka-Cray, P.J. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 34, S93–S106. [CrossRef] [PubMed]
 71. Messenger, A.M.; Barnes, A.N.; Gray, G.C. Reverse zoonotic disease transmission (Zoonoanthroponosis): A systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLoS ONE* 2014, 9, e89055.[CrossRef]
 72. Molbak K, Gerner-Smidt P, Wagener HC (2002). Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg Infect Dis*, 8(5):514-515.
 73. Moraru R, Pourcher A-M, Jadas-Hecart A, Kempf I, Ziebal C, Kervarrec M, Comunal PY, Mareș M, Dabert P (2012). Changes in concentration of fluoroquinolones and of ciprofloxacin-resistant enterobacteriaceae in chicken feces and manure stored in a heap. *J Environ Quality*, 41(3):754-63.
 74. Morris DO (2005). *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners, *Emerg Infect Dis*, 11(1):83-88.
 75. Morris, D.O.; Rook, K.A.; Shofer, F.S.; Rankin, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: A retrospective review of 749 isolates (2003–2004). *Vet. Dermatol.* 2006, 17, 332–337. [CrossRef]
 76. O'Neill J., 2014, Antimicrobial resistance:Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance.
 77. O'NEILL J., 2016, The review on antimicrobial resistance / Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
 78. Olivares, J.; Bernardini, A.; Garcia-Leon, G.; Corona, F.; Sanchez, M.B.; Martinez, J.L. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 103. [CrossRef] [PubMed]
 79. Pappas G (2012). You can teach old pathogens new tricks: the zoonotic potential of *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, and enterococci, or from Noah's Ark to Pandora's Box. *Clin Microbiol Infect*, 18(7):617-618.
 80. Perry, J.;Waglechner, N.;Wright, G. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6, a025197. [CrossRef] [PubMed]
 81. Perry, J.A.;Westman, E.L.;Wright, G.D. The antibiotic resistome: What's new? *Curr. Opin. Microbiol.* 2014, 21, 45–50. [CrossRef] [PubMed]
 82. Pitta, D.W.; Dou, Z.; Kumar, S.; Indugu, N.; Toth, J.D.; Vecchiarelli, B.; Bhukya, B. Metagenomic Evidence of the Prevalence and Distribution Patterns of Antimicrobial Resistance Genes in Dairy Agroecosystems. *Foodborne Pathog. Dis.* 2016, 13, 296–302. [CrossRef]

83. Pomba, C.; Rantala, M.; Greko, C.; Baptiste, K.E.; Catry, B.; van Duijkeren, E.; Mateus, A.; Moreno, M.A.; Pyörälä, S.; Ružauskas, M.; et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, 72, 957–968. [CrossRef] [PubMed]
84. Rafique, M.; Potter, R.F.; Ferreira, A.; Wallace, M.A.; Rahim, A.; Ali Malik, A.; Siddique, N.; Abbas, M.A.; D'Souza, A.W.; Burnham, C.D.; et al. Genomic Characterization of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated From Domestic Chickens in Pakistan. *Front. Microbiol.* 2020, 10, 3052. [CrossRef]
85. Rao, S.; Van Donkersgoed, J.; Bohaychuk, V.; Besser, T.; Song, X.M.; Wagner, B.; Hancock, D.; Renter, D.; Dargatz, D.; Morley, P.S. Antimicrobial drug use and antimicrobial resistance in enteric bacteria among cattle from alberta feedlots. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010, 7, 449–457. [CrossRef] [PubMed]
86. Rendle, D.I.; Page, S.W. Antimicrobial resistance in companion animals. *Equine Vet. J.* 2018, 50, 147–152. [CrossRef] [PubMed]
87. Riviere, J.E., Papich, M.G., 2009, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9th-ed, chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwell
88. Rowan, A.; Kartal, T. Dog population & dog sheltering trends in the United States of America. *Animals* 2018, 8, 68.
89. Sabino, Y.N.V.; Santana, M.F.; Oyama, L.B.; Santos, F.G.; Moreira, A.J.S.; Huws, S.A.; Mantovani, H.C. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nat. Commun.* 2019, 10, 5252. [CrossRef]
90. Santos, L.; Ramos, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018, 52, 135–143. [CrossRef]
91. Scott, L.C.; Menzies, P.I. Antimicrobial Resistance and Small Ruminant Veterinary Practice. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 2011, 27, 23–32. [CrossRef]
92. Selzer PM (2009). *Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery - From Molecular Targets to Drug Candidates*. Wiley-Blackwell-VCH, DE. (ISBN:978-3-527-32327-2)
93. Seyedmojtaba S., Bosco S.M, Hoog S., Ebel F., Elad D., Gomes R., Jacobsen I., Jensen H., Martel A., Mignon B., Pasmans F., Piecková E., Rodrigues A.M., Singh K., Vicente V., Wibbelt G., Wiederhold N., Guillot J., 2018, Fungal infections in animals: a patchwork of different situations, *Med Mycol.*; 56(Suppl 1): S165–S187
94. Silbergeld, E.K.; Graham, J.; Price, L.B. Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annu. Rev. Public Health* 2008, 29, 151–169. [CrossRef]
95. Sommer, M.O.; Church, G.M.; Dantas, G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence* 2010, 4, 299–303. [CrossRef] [PubMed]
96. Stenuit, B.; Agathos, S.N. Deciphering microbial community robustness through synthetic ecology and molecular systems synecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, 33, 305–317. [CrossRef]
97. Stokstad, E.L.R.; Jukes, T.H. Further Observations on the “Animal Protein Factor” (17751). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950, 73, 1950. [CrossRef]
98. Sultan, I.; Rahman, S.; Jan, A.T.; Siddiqui, M.T.; Mondal, A.H.; Haq, Q.M.R. Antibiotics, resistance and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2066. [CrossRef]
99. Sykes, J.E., Papich, M.G., 2013, *Antifungal Drugs*. In *Canine and Feline Infectious Diseases*, (pp.87-96), Ed. Elsevier
100. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* Disponibil la: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>
101. Theelen BM, Silvestri E, Gueho A, Van Belkumand T (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment-length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast*

- Res,1(2): 79-86.
102. Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V.M.; Spina, A.A.; Soggiu, A.; Britti, D.; Roncada, P.; Piras, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J. Proteom.* 2020, 210, 103534. [CrossRef]
 103. UK-VARSS (2019). UK Veterinary Antibiotic Resistance and Sales Surveillance Report (UK-VARSS 2018). New Haw, Addlestone: Veterinary Medicines Directorate
 104. Varaldo, P.E.; Facinelli, B.; Bagnarelli, P.; Menzo, S.; Mingoia, M.; Brenciani, A.; Giacometti, A.; Barchiesi, F.; Brescini, L.; Cirioni, O.; et al. Antimicrobial Resistance: A Challenge for the Future. In *The First Outstanding 50 Years of "Università Politecnica Delle Marche"*; Springer: Cham, Switzerland, 2020.
 105. VerBerkmoes, N.C.; Denef, V.J.; Hettich, R.L.; Banfield, J.F. Systems Biology: Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 196–205. [CrossRef] [PubMed]
 106. Wegener HC (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Op Microbiol*, 6:439-445.
 107. Welch RA, Burland V, Plunkett I (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 99(26):1720-1724.
 108. Wiederhold, N.P., 2017, Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, *Infect Drug Resist.*, Aug 29;10:249-259.
 109. World Health Organisation (WHO) (2015). *Data Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation.* (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillance-system-manual/en/>
 110. World Health Organisation (WHO) (2015). *Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance* ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1
 111. World Health Organization (WHO) (2001). *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups.* WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10
 112. World Health Organization, 2014, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, ISBN 978 92 4 156474 8 (NLM classification: QV 250),
 113. Wright, G.D. The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 175–186. [CrossRef]
 114. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol*, 42(8):3483-3489.
 115. ***https://www.eca.europa.eu/lists/ecadocuments/sr19_21/sr_antimicrobial_resistance_ro.pdf
 116. ***http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf
 117. ***http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC50004307.pdf
 118. ***http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058008d7ad
 119. ***<http://www.veterinarypharmacon.com/docs/899-Curs-4-5.S.II.pdf>
 120. ***<https://antibiotic.ecdc.europa.eu/ro/informati-vafise-informativa/fisa-informativa-pentru-specialisti>
 121. ***https://en.wikipedia.org/wiki/One_Health
 122. ***https://eupha.org/repository/advocacy/AMR_e-collection_27-02_RO_final_.pdf
 123. ***<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>
 124. *** <https://academic.oup.com/mmy/article/53/7/743/960703>
 125. ***https://www.researchgate.net/publication/47789768_An_azoleresistant_isolate_of_Malassezia_pachydermatis
 126. ***<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325069/>
 127. ***<https://academic.oup.com/mmy/article/57/3/346/5003023>
 128. *** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26949597/>



R.1.1.3 Anchetă retrospectivă privind rezistența microbiană la produsele antimicrobiene

129. *** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913535/>
130. *** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26316211/>