
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modularea susceptibilității la antibiotice prin condiții de mediu la tulpini de *E.coli* izolate de la curci

Doctorand **Ionuț Ionuț**

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Marina Spînu**



Rezistența la antibiotice reprezintă o problemă globală cu implicații semnificative asupra sănătății umane și a animalelor (WHO, 2014). Studiile în acest domeniu sunt cruciale pentru înțelegerea și combaterea acestei probleme. Bacteriile rezistente la antibiotice pot deveni pan-rezistente, reprezentând o amenințare majoră pentru sănătatea mondială.

Programele naționale de supraveghere au fost implementate în multe țări europene, dar armonizarea este necesară pentru compararea datelor (DE JONG, 2013). Cercetătorii încearcă să înțeleagă originea și evoluția rezistenței la antibiotice la nivel epidemiologic, de genotip, genom și fenotip (BELLO-LÓPEZ, 2019). Mecanismele de rezistență la antibiotice au evoluat și au devenit componente ale fiziologiei bacteriene de bază, ceea ce a condus la o rezistență mai generalizată (JAYARAMAN, 2009).

Modificările de pH pot influența rezistența la antibiotice, dar mecanismele exacte nu sunt pe deplin înțelese (CULEBRAS, 1996). În plus, bacteriile au dezvoltat rezistență nu numai la antibiotice, ci și la metalele grele, iar acest fenomen poate fi influențat și de practicile agricole și medicale (HOBMAN, 2015; ARGUDÍN, 2018).

Prin înțelegerea mai profundă a interacțiunilor dintre factorii de mediu, cum ar fi pH-ul și metalele grele, și dezvoltarea rezistenței bacteriene la antibiotice, există posibilitatea de a dezvolta noi abordări pentru controlul antibioretistenței (DE JONG, 2013; BELLO-LÓPEZ, 2019; JAYARAMAN, 2009; CULEBRAS, 1996; HOBMAN, 2015; DAS, 2016; ARGUDÍN, 2018). Studiile în acest domeniu aduc contribuții importante pentru dezvoltarea de strategii eficiente de combatere a acestei amenințări globale la adresa sănătății publice și a sănătății animalelor.

Teza de doctorat intitulată „Modularea susceptibilității la antibiotice prin condiții de mediu la tulpini de *E. coli* izolate de la curci” este structurată în două părți, fiecare dintre ele cuprinzând o serie de capitole, concepute conform normelor în vigoare.

Partea I „Stadiul actual al cunoașterii” este divizată în 3 capitole și descrie sintetic informații disponibile în literatura de specialitate cu privire la taxonomia și importanța bacteriei *E. coli*, antibiotice și antibioretistență, precum și interacțiuni cunoscute ale acestora cu factorii de mediu.

Primul capitol descrie succint aspecte referitoare la taxonomia, ecologia, izolare, identificarea, patogenitatea și importanța bacteriei *Escherichia coli*, subliniând variabilitatea și versatilitatea sa ca model de studiu reprezentativ.

Capitolul al doilea este o trecere în revistă a aspectelor fundamentale legate de antibiotice și antibioretistență. Acest capitol prezintă mecaismele de acțiune al diferitelor clase de antibiotice și sumarizează mecanismele de rezistență la antibiotice împreună cu transmiterea antibioretistenței și influența factorilor de mediu asupra acesteia.

În **capitolul al treilea** sunt prezentate informații disponibile în literatura de specialitate cu privire la influența factorilor de mediu asupra *E. coli* cu centrare impactul pH-ului și al metalelor grele cadmiu și plumb.

Partea a doua prezintă contribuția personală și este structurată în 6 capitole care conțin rezultatele cercetărilor proprii conduse potrivit scopului și obiectivelor lucrării care sunt prezentate în **capitolul 4**.

Capitolul 5 prezintă originea probelor, protocolul de izolarea și identificarea tulpinilor *E. coli* de studiu, metodologia de evaluare a susceptibilității la antibiotice precum și etapele de stabilire a antibioticelor de studiu, selecție a tulpinilor pentru studiu și rezultatele testelor de susceptibilitate inițială la antibiotice a tulpinilor studiate.

În cadrul studiului, au fost analizate profilurile de antibioticorezistență ale unui total de 48 de tulpini de *Escherichia coli*, care au fost izolate de la 67 de indivizi. Pentru a include tulpini reprezentative cu și fără rezistență la antibiotice, tulpini patogene și nepatogene, din diverse categorii de vârstă și din diferite sisteme de creștere, selecția finală a inclus 19 tulpini sălbatice (notate Pr1 până la Pr19), împreună cu tulpina de referință *E. coli* ATCC25922 (notată Pr20).

Pentru izolarea și identificarea tulpinilor de studiu din probele recoltate de la curci s-a utilizat pentru izolare agarul MacConkey, coloniile prezumtive de enterobacterii, în urma obținerii culturilor pure, au fost trecute pe Agar nutritiv și confirmate prin testul oxidazei, testul indolului și testul pentru beta-glucuronidază utilizând agar TBX.

Pentru evaluarea susceptibilității inițiale la antibiotice a tulpilor de *Escherichia coli* s-a utilizat metoda difuzimetrică cu discuri impregnate cu substanțele antimicrobiene (antibiograma Kirby-Bauer), după recomandările indicate de Comitetul European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (EUCAST).

Studiere susceptibilități la antimicrobiene a fost evaluată ținând seama de antibioticele de uz curent în medicina veterinară și respectiv în cea umană pentru a avea o relevanță și aplicabilitate/impact în practica actuală. Au fost alese 12 substanțe sau combinații de antimicrobiene segregate în 2 seturi, unul de uz veterinar (oxitetraciclină T30, amoxicilină AX25, florfenicol FFC30, sulfametoxazol + trimetoprim SXT25, colistin CT10, enrofloxacină ENR5) și unul de uz uman (doxiciclină DO30, cefotaxim CTX30, cefotaxim+acid clavulanic CTC40, azitromicină AZM15, gentamicină CN30, ciprofloxacina CIP5).

În setul de uz uman am integrat un sistem pentru a determina dacă o tulpină este fenotipic pozitivă pentru producția de ESBL, am utilizat un criteriu specific conform ghidului EUCAST, conform căruia diametrul zonei de inhibiție generată de combinația Cefotaxim + Acid Clavulanic trebuie să fie cu cel puțin 5mm mai mare decât diametrul zonei de inhibiție produsă de Cefotaxim singur (GISKE, 2017).

Am analizat în profunzime rezultatele antibiogramelor inițiale obținute pentru cele 20 de tulpini selectate de *Escherichia coli*, oferind o perspectivă detaliată asupra rezistenței lor antimicrobiene.

Au fost observate multiple rezistențe pentru Pr1 (CIP5, ENR5, AX25), Pr2 (ENR5), Pr3 (CIP5, ENR5, AX25), Pr4 (CIP5, ENR5, AX25), Pr5 (CIP5, ENR5), Pr6 (CTC40, DO30, T30, ENR5), Pr7 (AX25, ENR5), Pr8 (CIP5, T30, ENR5, AX25), Pr9 (CIP5, DO30, T30, ENR5, AX25) și Pr10 (CTC40).

Analizând rezultatele testării susceptibilității inițiale la antibiotice pentru primele 10 izolate de *Escherichia coli* (Pr1-Pr10), putem observa o varietate de cazuri de rezistență. În special, se poate observa o rată crescută a rezistenței față de fluorochinolone și amoxicilină, ceea ce indică faptul că tulpinile sălbatice izolate au fost expuse anterior la aceste substanțe și s-au adaptat prin dezvoltarea de mecanisme generale și specifice de rezistență. În plus, s-au identificat și tulpini cu rezistență multidrog, conform definiției propuse de Magiorakos et al. (2012), care se referă la

"nesusceptibilitate dobândită la cel puțin un agent antimicrobian din trei sau mai multe categorii". Tulpinile Pr6, Pr8 și Pr9 îndeplinesc aceste criterii și se încadrează în această categorie, evidențiind un nivel ridicat de rezistență la multiple clase de antibiotice. Sistemul integrat de detecție a ESBL nu a identificat nicio tulpină fenotipic pozitivă pentru producția de beta-lactamaze cu spectru extins.

În urma analizei rezultatelor testării susceptibilității inițiale la antibiotice pentru ultimele 10 tulpini de *Escherichia coli* (Pr11-Pr20), se observă o multitudine semnificativă de cazuri de rezistență: Pr11 (CIP5, ENR5), Pr12 (AZM15, DO30, CIP5, T30, ENR5, SXT25, AX25), Pr13 (DO30, CIP5, T30, ENR5, SXT25, AX25), Pr14 (fără rezistență), Pr15 (CTX30, CIP5, T30, AX25, ENR5, FFC30, SXT25), Pr16 (DO30, CIP5, T30, ENR5, FFC30, AX25), Pr17 (CTC40, DO30, CIP5, T30, AX25, ENR5, FFC30, SXT25), Pr18 (DO30, CIP5, T30, ENR5), Pr19 (CTC40, DO30, CIP5, AX25, T30, ENR5) și Pr20 (fără rezistență).

În mod special, se evidențiază o rată crescută a rezistenței față de reprezentanți ai categoriilor tetraciline, peniciline β -lactamice, fluorochinolone și sulfamide potențate. S-au identificat tulpini cu rezistență multidrog, care sunt nesusceptibile față de până la 7 din cele 12 antibiotice testate, care aparțin la 4 clase diferite de antibiotice. Tulpinile Pr12, Pr13, Pr15, Pr16, Pr17 și Pr19 se încadrează în această categorie, evidențiind un nivel ridicat de rezistență la multiple clase de antibiotice. Aceasta denotă prezența unor mecanisme complexe de rezistență, care permit tulpinilor să supraviețuiască și să se adapteze la presiunea exercitată de diferitele antibiotice utilizate în studiu.

În mod general, tulpinile considerate nepatogene (Pr9-Pr19) prezintă un număr mai mare de cazuri de rezistență la antibiotice în comparație cu tulpinile izolate de la indivizii morți cu semne de boală (Pr1-Pr8). Percentajul total al cazurilor de rezistență la antibiotice în tulpinile izolate în contexte de boală reprezintă 10,78% din total, în timp ce tulpinile izolate de la indivizii clinic sănătoși reprezintă 26,47%, ceea ce este în esență dublu față de cele considerate patogene.

În **capitolul 6** este prezentat experimentul de evaluare a evoluției susceptibilității la antibiotice în condiții de mediu în care sunt modificări de pH. Acest capitol cuprinde etapele de concepere și descriere a protocolului experimental ca materiale și metode, urmate de rezultatele și discuțiile din care la final au fost trase concluziile pentru studiul influenței pH-ului pe baza analizei celor 1440 de testări totale efectuate.

Am stabilit două intervale de timp (3 și 7 zile) pentru expunerea bacteriilor la pH-uri diferite și am selectat trei valori de pH distincte (4,5, 6,0 și 8,5) pentru a examina impactul lor asupra rezistenței bacteriilor. Am realizat un pre-studiu pentru a dezvolta un protocol reproductibil și precis pentru experiment.

Protocolul experimental a implicat obținerea unui mediu de cultură acid folosind un acidifiant comercial cu compoziție chimică specifică. Mediul de cultură lichid Lennox L-B a fost sterilizat și pH-ul este ajustat la două valori diferite (pH 4,5 și pH 6,0). De asemenea folosind soluție de NaOH s-a obținut mediul de cultură alcalin, pH 8,5. Tulpinile de *Escherichia coli* au fost inoculate în mediile de cultură cu cele trei pH-uri. După incubare timp de trei zile, sedimentul este transferat în tuburi noi cu același pH și continuă incubarea. Colonii izolate sunt obținute din tuburile inițiale și sunt testate pentru susceptibilitatea la antibiotice după trei zile de expunere la mediul cu

pH modificat. Antibioticele selectate sunt testate folosind același protocol ca în testul inițial de susceptibilitate. În ziua a șaptea coloniile izolate obținute din tuburile expuse la variații de pH sunt însămânțate din nou pe plăci de agar MH pentru fiecare pH și sunt evaluate în privința susceptibilității la antibiotice la fel ca anterior.

Înainte de a analiza efectele modificărilor de pH asupra antibioticorezistenței tulpinilor de *Escherichia coli*, am efectuat evaluări ale martorilor blanc. Această evaluare a implicat supunerea în duplicat a două tulpini, Pr20 (*E. coli* ATCC25922) și Pr13, la aceleași condiții experimentale, dar fără a ajusta pH-ul mediului de cultură Lennox LB și au fost cultivate timp de 3 și, respectiv, 7 zile. Pentru a evalua semnificația diferențelor rezultatelor, în lipsa unor studii disponibile, din cunoștințele noastre la momentul actual, care să furnizeze un punct de referință, am procedat în felul următor: am identificat cea mai mare diferență absolută între rezultatele antibiogramelor inițiale și rezultatele martorilor blanc. Astfel, orice valoare absolută a diferenței mai mare decât acest punct de referință este considerată semnificativă și atribuită factorului de mediu studiat. Pentru studiul de evoluție a susceptibilității la antibiotice în condiții de mediu în care sunt modificări de pH, punctul de referință a fost determinat ca fiind 3,26 mm.

În etapa următoare a studiului, am efectuat testările în diferitele condiții de pH asupra rezistenței la antibiotice, utilizând pH-urile 4,5, 6,0 și 8,5. Am înregistrat și analizat rezultatele obținute în urma acestor testări și le-am comparat cu rezultatele inițiale ale testelor de susceptibilitate la antibiotice. Astfel, am analizat dacă există diferențe semnificative în rezistența la antibiotice în funcție de pH-ul utilizat, antibiotele testate și timpul de expunere al tulpinilor de *E. coli*.

Valoarea minimă a fost -5,50 mm față de diametrului zonei de inhibiție inițiale, la tulpina Pr16, antibiotele azitromicină, pH 4,5 și timp de expunere 3 zile. Valoarea maximă +6,16 mm față de diametrului zonei de inhibiție inițiale, la tulpina Pr10, antibiotele cefotaxim, pH 8,5 și timp de expunere 7 zile.

Interpretarea sumativă a rezultatelor obținute este prezentată sintetic în tabelele 1-4 folosind notările: Număr total de diferențe (ND), Număr total de diferențe semnificative (NS), Procent total de diferențe semnificative (%S), Maxim (M), Minim (m), Valoare absolută de referință (VR), Procent de diferențe semnificativ negative (%-), Procent de diferențe semnificativ pozitive (%+), Număr total de diferențe semnificativ negative (NS-) Număr total de diferențe semnificativ pozitive (NS+).

Tabel 1. Privire generală asupra rezultatelor studiului de influență a pH-ului

ND	VR	NS	%S	M	m	%-	%+	NS-	NS+
1440	3,26 mm	105	7,29%	+6,16 mm	-5,50 mm	4,38 %	2,92%	63	42

Tabel 2. Interpretarea rezultatelor în funcție de pH

pH 4,5		pH 6,0		pH 8,5	
m	M	m	M	m	M
-5.50 mm	+5.69 mm	-4.61 mm	+5.43 mm	-4.55 mm	+6.16 mm
NS	%S	NS	%S	NS	%S
33	2.29%	41	2.85	31	2.15
%-	%+	%-	%+	%-	%+
1.60%	0.69%	1.67%	1.18%	1.11%	1.04%
NS-	NS+	NS-	NS+	NS-	NS+
23	10	24	17	16	15

Tabel 3. Interpretarea rezultatelor în funcție de antibiotic

AZM15	CN30	CTX30	CTC40	DO30	CIP5	T30	AX25	FFC30	SXT25	CT10	ENR5
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
+5.69	+4.08	+6.16	+4.46	+4.07	+6.05	+4.32	+4.20	+4.73	+3.53	+2.57	+3.97
m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
-5.50	-5.07	-4.60	-4.61	-3.47	-4.16	-3.39	-4.55	-4.40	-4.25	-2.66	-4.40
%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S
1.88	0.49	0.97	0.69	0.28	0.69	0.35	0.63	0.63	0.35	0.00	0.35
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
27	7	14	10	4	10	5	9	9	5	0	5
%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+	%+
0.90	0.21	0.21	0.21	0.07	0.21	0.28	0.21	0.21	0.21	0.00	0.21
%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-	%-
0.97	0.28	0.76	0.49	0.21	0.49	0.07	0.42	0.42	0.14	0.00	0.14
NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+	NS+
13	3	3	3	1	3	4	3	3	3	0	3
NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-	NS-
14	4	11	7	3	7	1	6	6	2	0	2

Tabel 4. Interpretarea rezultatelor în funcție de timpul de expunere

3 zile				7 zile			
%-	%+	m	M	%-	%+	m	M
1.88	1.39	-5.50	+4.46	2.50	1.53	-5.07	+6.16
NS-	NS +	NS	%S	NS -	NS +	NS	%S
27	20	47	3.26	36	22	58	4.03

Concluziile pentru rezultatele studiului sunt următoarele:

Analiza datelor a fost efectuată utilizând metode statistice adecvate pentru a evalua semnificația și corelațiile dintre variabilele analizate: pH-ul utilizat, antibioticul testat și timpul de expunere al tulpinilor de *E. coli*.

În total, au fost realizate 1440 de testări (zone de inhibiție) pentru toate tulpinile, antibioticele, pH-urile și timpii de expunere.

Expunerea *E. coli* la diferite valori de pH a demonstrat influența globală de reducere a susceptibilității la antibioticele evaluate mai degrabă decât creșterea acesteia, aparent valorile reduse crescând rezistența iar valorile mai mari de pH crescând sensibilitatea. Aceste modificări depind cu siguranță și de antibioticul testat.

Timpul de expunere la factorul pH a avut un rol crucial, cel mai îndelungat interval rezultând în numărul cel mai mare de modificări ale sensibilității/rezistenței.

Numărul variațiilor în sens negativ sau pozitiv al rezistenței/sensibilității față de antibiotic dintre toate tulpinile și antibioticele testate este de asemenea condiționat de pH, astfel valorile acide induc preponderent scăderi, numărul cel mai mare de scăderi apare la aciditatea medie, dar valoarea celei mai drastice scăderi este indusă de pH-ul cel mai acid, în timp ce la pH-ul cel mai ridicat apare creșterea cea mai mare a susceptibilității, dar numărul de variații în sens pozitiv sau negative este aproximativ egal.

Analiza efectuată în funcție de antibioticul testat a relevat că azitromicina a înregistrat cele mai multe diferențe semnificative. Alte antibiotice precum gentamicina, cefotaximul, cefotaximul cu acid clavulanic, doxiciclina, oxitetraciclina, amoxicilina, florfenicolul, sulfametoxazolul cu trimetoprim, colistinul, enrofloxacină și

ciprofloxacină au prezentat, de asemenea, diferențe semnificative în răspunsul tulpinilor de *E. coli* la diferite condiții de expunere.

În concluzie, studiul a demonstrat că pH-ul utilizat, antibioticul testat și timpul de expunere sunt factori importanți care influențează susceptibilitatea tulpinilor de *E. coli* la antibiotice. Analiza detaliată a acestor factori poate ajuta la înțelegerea și abordarea corectă a rezistenței la antibiotice, având potențialul de a sprijini dezvoltarea de strategii inovatoare pentru combaterea rezistenței bacteriilor la nivel global.

După același tipar ca în capitolul anterior a fost structurat și **capitolul 7** care prezintă cel de-al doilea experiment de evaluare a evoluției susceptibilității la antibiotice în condiții de mediu în care sunt prezente metale grele, al căror concluzii au fost enunțate în urma analizei unui număr total de 1920 de testări.

Protocolul experimental a fost conceput în linii mari, urmărind o structură similară cu cea din studiul anterior, cu variații de pH, dar de data aceasta, factorul de mediu investigat au fost metalele grele cadmiu și plumb. Pentru concentrațiile de metale grele, s-au selectat valorile de 5 $\mu\text{g/L}$ și 50 $\mu\text{g/L}$. Această alegere a fost motivată de mai multe considerente importante. Concentrațiile alese sunt în concordanță cu valorile întâlnite în mod uzual în anumite areale, precum Delta Dunării, unde metalele grele sunt prezente în apă și sediment. Concentrațiile selectate sunt în conformitate cu valorile de referință reglementate legislativ pentru apa de suprafață, conform ORDIN 161/2006. În plus, alegerea acestor concentrații este justificată și de faptul că nu influențează semnificativ valoarea pH-ului, având în vedere că soluția în care sunt suspendate metalele grele conține acid azotic. Desfășurarea experimentului a fost implementată conform protocolului descris anterior la studiul influenței pH-ului asupra antibioticorezistenței. Tulpinile de *E. coli* (Pr1-Pr20), au fost expuse factorilor de mediu (cadmiu și plumb în concentrație de 5 și 50 $\mu\text{g/L}$) timp de 3 și respectiv 7 zile, iar susceptibilitatea la antibiotice a fost evaluată conform pașilor descriși în studiul anterior.

Înainte de a evalua impactul metalelor grele asupra antibioticorezistenței tulpinilor de *Escherichia coli*, s-au efectuat teste de control utilizând două tulpini în duplicat, Pr13 și Pr20 (*E. coli* ATCC25922). Aceste tulpini au fost supuse aceluiași condiții experimentale, cu excepția faptului că mediul de cultură Lennox LB a fost aditivat doar cu excipienții suspensiei de metale grele, fără să conțină metalele propriu-zise. Apoi, aceste tulpini au fost cultivate timp de 3 și, respectiv, 7 zile.

În absența unor studii disponibile care să ofere un punct de referință, pentru a evalua semnificația diferențelor dintre rezultate, s-a procedat în felul următor: s-a identificat cea mai mare diferență absolută între rezultatele antibiogramelor inițiale și cele ale martorilor blanc. Această diferență a fost considerată punctul propriu de referință pentru interpretarea ulterioară a diferențelor generate de expunerea la metale grele. Astfel, orice valoare absolută a diferenței mai mare decât acest punct de referință a fost considerată semnificativă și atribuită factorului de mediu investigat.

Pentru studiul de evoluție a susceptibilității la antibiotice în condiții de mediu în care sunt prezente metale grele punctul de referință a fost determinat ca fiind 3,43mm.

În etapa următoare a studiului, s-au efectuat testările în diferitele condiții de prezență a metalelor grele asupra rezistenței la antibiotice, utilizând cadmiu și plumb în concentrații de 5 și 50 $\mu\text{g/L}$. S-au înregistrat și analizat rezultatele obținute în urma

acestor testări și s-au comparat cu rezultatele inițiale ale testelor de susceptibilitate la antibiotice. S-au analizat rezultatele în funcție de metalul utilizat, concentrația acestuia, antibioticul testat și timpul de expunere. S-au observat și s-au înregistrat variațiile și tendințele în rezistența la antibiotice în funcție de aceste criterii.

Tabel 8. Privire generală asupra rezultatelor studiului de influență a metalelor grele

ND	VR	NS	%S	M	m	%-	%+	NS-	NS+
1920	3.43mm	146	7.60%	+6.55 mm	-6.12 mm	0.52 %	7.08 %	10	136

Tabel 9. Interpretarea rezultatelor în funcție de metal

Cadmium				Plumb			
NS	%S	M	m	NS	%S	M	m
62	3.23	+6.55	-6.12	84	4.38	+6.40	-4.08
NS +	%+	NS -	%-	NS +	%+	NS -	%-
56	2.92	6	0.31	80	4.17	4	0.21

Tabel 10. Interpretarea rezultatelor în funcție de concentrație

5 µg/L				50 µg/L			
NS	%S	M	m	NS	%S	M	m
70	3.65	+6.40	-4.77	76	3.96	+6.55	-6.12
NS +	%+	NS -	%-	NS +	%+	NS -	%-
67	3.49	3	0.16	69	3.59	7	0.36

Tabel 11. Interpretarea rezultatelor în funcție de timpul de expunere

3 zile				7 zile			
%-	%+	m	M	%-	%+	m	M
0.16	3.18	-6.12	+5.98	0.36	3.91	-5.83	+6.55
NS-	NS +	NS	%S	NS -	NS +	NS	%S
3	61	64	3.33	7	75	82	4.07

Rezultatele noastre au relevat impactul metalelor grele (cadmiu și plumb) în diferite concentrații asupra susceptibilității tulpinilor de *E. coli* la antibiotice, în funcție de timpul de expunere.

În urma tuturor testărilor efectuate, s-a observat că metalele grele, independent de tip, concentrație sau timpul de expunere influențează în sens de creștere susceptibilitatea la toate antibioticele testate.

Diferențele existente între cele două metale pledează în favoarea plumbului, pentru care numărul de valori care indică augmentarea sensibilității este mai mare.

Concentrația în care s-au aplicat metalele grele influențează mai puțin sensibilitatea, în sensul că ambele concentrații au indus creșterea remarcabilă a sensibilității.

În funcție de antibioticul testat, s-au observat diferențe semnificative în susceptibilitatea tulpinilor de *E. coli* la antibiotice. Cefotaximul în combinație cu acidul clavulanic a generat cele mai multe diferențe semnificative, urmat de oxitetraclina, amoxicilină, și sulfametoxazol combinat cu trimetoprim.

Timpul de expunere la acțiunea metalelor grele este direct corelat cu efectul obținut, sensibilitatea crescând la 7 zile de expunere.

În concluzie, rezultatele relevă modul în care metalele grele influențează susceptibilitatea tulpinilor de *E. coli* la antibiotice, în funcție de concentrație și timpul

de expunere. Aceste observații ne ajută să înțelegem mai bine interacțiunea complexă dintre factorii de mediu și susceptibilitatea bacteriilor la tratamentul cu antibiotice.

Concluziile generale care se desprind din lucrarea „Modularea susceptibilității la antibiotice prin condiții de mediu la tulpini de *E. coli* izolate de la curci” sunt formulate și structurate în **capitolul 8**.

Analiza comparativă a rezultatelor obținute în studiul de pH și cel al metalelor grele a relevat diferențe semnificative în susceptibilitatea tulpinilor de *Escherichia coli* la antibiotice în funcție de factorul de mediu investigat.

În cadrul studiului de pH, s-a observat că modificarea pH-ului mediului de cultură Lennox LB a avut un impact semnificativ asupra rezistenței la antibiotice a tulpinilor de *E. coli*. pH-ul mediului influențează susceptibilitatea bacteriilor la tratamentul cu antibiotice, cu variații observate în funcție de antibioticul testat, timpul de expunere și pH-ul utilizat.

La pH 4,5 s-au înregistrat cele mai accentuate schimbări în sens negativ (scăderi ale susceptibilității) iar la pH 8,5 în sens pozitiv (creșteri ale susceptibilității la antibiotice). La pH 6,0 s-au observat cele mai multe modificări semnificative, preponderent negative, dar cu o intensitate mai mică decât la pH 4,5 și 8,5.

În ceea ce privește antibioticele testate, azitromicina a prezentat cea mai mare variație a zonelor de inhibiție, cu schimbări semnificative atât în sens pozitiv, cât și negativ. Aminoglicozida gentamicina și cefalosporina cefotaxim au generat și ele diferențe semnificative în susceptibilitatea la antibiotice. În schimb, colistinul nu a prezentat modificări semnificative, ceea ce indică o stabilitate a susceptibilității la acest antibiotic în condițiile de pH testate.

Antibioticele cefotaxim + acid clavulanic, oxitetraciclina, amoxicilină și sulfametoxazol combinat cu trimetoprim au prezentat cele mai multe diferențe semnificative în susceptibilitatea la antibiotice în prezența metalelor grele.

Durata expunerii la pH diferit a avut de asemenea un impact asupra rezistenței la antibiotice. Expunerea timp de 7 zile a generat cele mai multe modificări semnificative de creșteri semnificative ale susceptibilității și scăderile cele mai mari au fost înregistrate la timpul de expunere de 3 zile.

În cadrul studiului metalelor grele, s-a observat că prezența cadmiului și a plumbului în mediul de cultură a determinat modificări semnificative ale susceptibilității la antibiotice. Aceste modificări au fost influențate de concentrația metalelor grele și timpul de expunere.

Concentrația de 50 $\mu\text{g/L}$ a determinat cele mai multe diferențe semnificative, cu o preponderență a creșterilor în diametrul zonei de inhibiție. Cu toate acestea, și la concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ s-au observat modificări semnificative în susceptibilitatea la antibiotice.

Comparând cele două studii, se poate observa că atât pH-ul, cât și metalele grele au un impact semnificativ asupra susceptibilității tulpinilor de *E. coli* la antibiotice. Rezultatele obținute arată că factorii de mediu pot influența modul în care bacteriile răspund la tratamentul cu antibiotice, ceea ce subliniază importanța luării în considerare a factorilor de mediu în cercetarea antibioticorezistenței.

În concluzie, acest studiu a adus noi informații despre modul în care pH-ul și prezența metalelor grele afectează susceptibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *Escherichia coli*. Rezultatele obținute pot contribui la o mai bună înțelegere a

interacțiunii complexe dintre factorii de mediu și rezistența la antibiotice și pot avea aplicații practice în gestionarea problemelor legate de criza antibioticelor în domeniul medical și în industria agroalimentară.

Capitolul 9 subliniază originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei:

Este un studiu care suplinește absența unor studii sau modele similare în investigarea influenței pH-ului și prezenței metalelor grele în mediul de viață al enterobacteriilor pentru evaluarea dinamicii antibioticorezistenței.

Este un studiu complet care investighează comparativ, susținut științific, antibioticorezistența/ susceptibilitatea *E. coli* patogene versus nepatogene la curci crescute în sistem industrial versus gospodăresc, de diferite categorii de vârstă și expuse unor protocoale de prevenție diferențiate.

Abordarea practică a antibioticorezistenței/ susceptibilității la o specie de rentă, care reprezintă totodată sursă de hrană, acoperă identificarea și informarea asupra unei plaje largi de potențiale surse de contaminare pentru mediu și om cu plasmide codificând rezistența la antibiotice.

Abordarea experimentală și rezultatele obținute în cadrul studiului permit investigarea impactului mediului de viață al *E. coli* asupra dezvoltării și răspândirii rezistenței bacteriene în diverse contexte și categorii de populație microbiană.

Factorii de influență aleși a fi investigați, pH-ul mediului și prezența de metale grele, sunt importanți nu doar pentru *E. coli*, rezultatele putând fi utilizate prin extrapolare în cazul altor *Enterobacteriaceae*, ci și pentru organismele gazdă, susținând elaborarea unor măsuri adaptate și adecvate celor trei laturi ale trunghiului epidemiologic: agent infectant, gazdă receptivă și mediul înconjurător.

Inovativ este modelul de studiu, creat pentru nevoile experimentale cu standardizarea de limite de interpretare atât pentru variațiile de pH cât și pentru intervenția metalelor grele, în funcție de natura lor și doza experimentală. Crearea punctului propriu de referință pentru interpretarea ulterioară a diferențelor generate de expunerea la pH sau metale grele facilitează prelucrarea unui volum impresionant de date.

Modul de analiză detaliată a acestor factori, care poate ajuta la înțelegerea și abordarea corectă a rezistenței la antibiotice, având potențialul de a sprijini dezvoltarea de strategii inovatoare pentru combaterea rezistenței bacteriilor la nivel global.

Teza este primul studiu care oferă simultan informații despre relevanța pH-ului dar și a metalelor grele în condiționarea rezistenței/sensibilității la antibiotice a *E. coli*, ierarhizând cele două elemente și demonstrând impactul mai pronunțat al metalelor grele, în funcție de concentrație și durata de expunere.