



**UNIVERSITATEA
„DUNĂREA DE JOS” DIN
GALAȚI**

Școala Doctorală de Inginerie



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

UNIVERSIDAD DE BURGOS

**Avances en Ciencia y
Biotecnología Alimentarias**

TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

Caracterizarea tulpinilor de Staphylococcus aureus metilino-rezistente izolate din produsele alimentare

Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Foods

Autor,

Drd. Ing. Elena-Alexandra ONICIUC

Conducător științific,

Prof. Dr. Ing. Anca Ioana NICOLAU

Conducător științific în cotutelă,

Prof. Dr. Vet. David RODRÍGUEZ-LÁZARO

Seria I4: Inginerie Industrială Nr. 47

Galați 2017



**UNIVERSITATEA
„DUNĂREA DE JOS” DIN
GALAȚI**

UNIVERSIDAD DE BURGOS

Școala Doctorală de Inginerie

**Avances en Ciencia y
Biotecnología Alimentarias**

Nr. Decizie Senat din

TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

Caracterizarea tulpinilor de Staphylococcus aureus metilino-rezistente izolate din produsele alimentare

Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Foods

Autor,

Drd. Ing. Elena-Alexandra ONICIUC

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Dr. Ing. Habil. Gabriela Râpeanu	Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Conducător de doctorat	Prof. Dr. Ing. Anca Ioana Nicolau	Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Conducător de doctorat în cotutelă	Prof. Dr. Vet. David Rodríguez-Lázaro	Universidad de Burgos
Referent	Conf. Dr. Vet. Marta Hernández Perez	Universidad de Valladolid
Referent	Prof. Dr. Biol. Mariana Carmen Chifiriuc	Universitatea din București
Referent	Prof. Dr. Ing. Daniela Borda	Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Seria I4: Inginerie Industrială Nr. 47

Galați 2017

Seriile tezelor de doctorat susținute public în "Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, începând cu 1 Octombrie 2013 sunt:

Domeniul ȘTIINȚE INGINEREȘTI

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul ȘTIINȚE ECONOMICE

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul ȘTIINȚE UMANISTE

Seria U 1: **Filologie-Engleză**

Seria U 2: **Filologie-Română**

Seria U 3: **Istorie**

Activitățile de cercetare realizate în prezenta teză au avut loc în diferite laboratoare, după cum urmează:

- ◆ Laboratorul de Analize fizico-chimice și microbiologice din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor (Galați, România);
- ◆ Laboratorul de Genetică din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor (Galați, România);
- ◆ Laboratorul de Microbiologie din cadrul Facultății de Științe (Burgos, Spania);
- ◆ Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid, Spania);
- ◆ Centrul de Inginerie Biologică din cadrul Universității din Minho (Braga, Portugalia).

Rezultatele cercetării prezentate în această teză au fost finanțate parțial de către proiectul de cercetare PROMISE - “*Protection of Consumers by Microbial Risk Mitigation Through Combating Segregation of Expertise*” (Proiect nr. 265877), unul dintre obiectivele acestuia fiind evaluarea prezenței a cinci agenți patogeni în alimente introduse în UE prin importuri necontrolate (www.promise-net.eu). *S. aureus* a fost investigat în materii prime și produse gata-de-consum (engl. RTE) de toți partenerii implicați în proiect, produsele fiind colectate fie din porturi și aeroporturi, fie de la granițele terestre ale UE.

În plus, doctorandul a beneficiat de diferite subvenții europene pentru realizarea activităților de cercetare, cum ar fi:

- ◆ COST Action “*A European Network for Mitigating Bacterial Colonisation and Persistence on Foods and Food Processing Environments*” grant (STSM-FA1202-011015-063402);
- ◆ FEMS Research Grant for Early Career Scientist (FEMS-RG-2015-0053);
- ◆ COST Action “*A European Network for Foodborne Parasites (Euro-FBP)*” grant (STSM-FA1408-33147);
- ◆ Mobilitate Erasmus+.

“We cannot fathom the marvelous complexity of an organic being; but on the hypothesis here advanced this complexity is much increased. Each living creature must be looked at as a microcosm- a little universe, formed of a host of self-propagating organisms, inconceivably minute and as numerous as the stars in heaven.”

– Charles Darwin

CUPRINS

	Rezumat	Teză
Mulțumiri		
Context actual și obiective cheie	i	i
Sumar.....	iv	iv
Abrevieri		vi
Lista de tabele		x
Lista de figuri.....		xi
PARTEA 1. INTRODUCERE	1	
CAPITOL 1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1	1
1.1. Istoric.....		1
1.2. Taxonomie		1
1.3. Habitat și răspândire		2
1.4. Necesități nutriționale și metabolism		3
1.5. Factori de virulență		4
1.6. Rezistența la antibiotice		7
1.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-rezistent	1	9
1.6.2. Epidemiologia MRSA		11
1.7. Prezența bacteriei <i>Staphylococcus aureus</i> , în principal MRSA, în lanțul alimentar.....		17
1.8. Formarea de biofilm și corelarea compoziției acestuia cu <i>S. aureus</i> izolat din surse alimentare		21
1.9. Strategii de prevenție și control.....		24
1.10. Programe de supraveghere în Uniunea Europeană		25
CAPITOL 2. Proceduri utilizate pentru detecția și identificarea bacteriei <i>Staphylococcus aureus</i>	2	27
2.1. Metode convenționale de detecție și identificare	2	27
2.2. Metode de caracterizare genetică.....	3	27
PARTEA 2. MATERIALE, ECHIPAMENTE ȘI METODE	4	
CAPITOL 3. Materiale și echipamente	4	32
3.1. Tulpini bacteriene		32
3.2. Medii de cultură.....		38
3.3. Enzime, reactivi și materiale		39
3.4. Oligonucleotide		42
3.5. Kit-uri comerciale		45
3.6. Echipamente și aparate.....		45

3.7. Secvențiere, instrumente de bioinformatică și baze de date utilizate ...		46
CAPITOL 4. Metode	4	48
4.1. Strategia de prelevare a probelor de alimente		48
4.2. Proceduri de detecție și izolare ale tulpinilor de <i>S. aureus</i>		48
4.3. Izolarea tulpinilor de MRSA		49
4.4. Extracția ADN-ului genomic.....		49
4.5. Cuantificarea acizilor nucleici în ceea ce privește concentrația, randamentul și puritatea acestora		51
4.6. Separarea fragmentelor de ADN prin electroforeză		51
4.7. Reacția de polimerizare în lanț a secvențelor de ADN		54
4.8. Secvențierea ADN-ului.....		56
4.9. Capacitatea de formare a biofilmelor		58
4.10. Caracterizarea matricei biofilmelor prin tratamente chimice și enzimatice		59
4.11. Caracterizarea compoziției matricei biofilmelor și vizualizarea acestora utilizând microscopul confocal		59
4.12. Profilul de rezistență la antibiotice		60
4.13. Analiză statistică		60
PARTEA 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	4	
CAPITOL 5. Detecția și identificarea bacteriei <i>Staphylococcus aureus</i> izolată din produsele alimentare provenite din piețe	4	62
Prelevarea probelor și izolatele identificate		62
Screening MRSA		63
Test de susceptibilitate antimicrobiană.....		63
Amprenta genetică.....		63
Tiparea și subtiparea elementului <i>SCCmec</i>		64
Detecția leucocidinei Panton–Valentine (PVL).....		64
Detecția genelor ce codifică enterotoxine		64
Rezultate și discuții.....	5	64
CAPITOL 6. Analiza compoziției biofilmelor formate de tulpini de <i>Staphylococcus aureus</i> izolate din surse alimentare	10	70
Tulpini bacteriene.....		70
Media screening și formarea biofilmelor în timp		71
Caracterizarea matricelor		71
Compoziția biofilmelor prin CLSM		71
Rezultate și discuții.....	10	72
Concluzii și perspective	12	73

CAPITOL 7. MRSA în alimentele care intră în Uniunea Europeană prin trafic transfrontalier și zboruri internaționale.....	13	76
Colecția de probe alimentare		77
Detecția și izolarea bacteriei <i>S. aureus</i>		77
Screening MRSA.....		77
Test de susceptibilitate antimicrobiană.....		77
Caracterizarea background-ului genetic		77
Detecția leucocidinei Panton–Valentine (PVL)		78
Profilul enterotoxigenic		78
Rezultate.....	13	79
Discuții	19	85
 CAPITOL 8. Formarea biofilmelor de către izolatele MRSA recuperate din surse alimentare, din bagajele pasagerilor care au efectuat zboruri din țări care nu sunt membre ale UE.....	21	88
Colecția MRSA și caracteristicile sale		89
Formarea biofilmelor și cuantificarea acestora		89
Viabilitatea celulelor prin stabilirea numărului CFU și determinarea substanței uscate		90
Compoziția structurală a matricei evidențiată prin CLSM		90
Analiză statistică		91
Rezultate.....	21	91
Discuții	26	95
Concluzii	27	96
 CAPITOL 9. Studiu de caz - Susceptibilitatea la oxacilină a <i>S. aureus mecA</i> pozitiv asociat cu produse alimentare europene.....	28	99
Tulpina bacteriană.....		100
Testarea fenotipică.....		100
Secvențierea genomului complet.....		100
Analiza datelor		100
Rezultate și discuții.....	28	101
Concluzii	32	105
 CAPITOL 10. Evaluarea unor medii cromogene pentru confirmarea tulpinilor de MRSA izolate din mediul clinic, animale și alimente de origine animală	34	110
Izolate bacteriene		110
Creșterea izolatelor bacteriene.....		111
Analiză statistică		111
Rezultate și discuții.....	34	111

PARTEA 4. DISCUȚII GENERALE.....		114
PARTEA 5. CONCLUZII.....	36	122
Anexe		126
Bibliografie selectivă.....	38	149
Lista lucrărilor publicate și prezentate la evenimente științifice	44	176
Curriculum vitae.....		245

Cuvinte cheie:

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus aureus*meticilino-rezistent, antibiotice, contaminare, siguranța alimentelor, importuri ilegale, industrie, biofilm, transmitere, supraveghere, UE.

Mulțumiri

Nu îmi vine să cred cât de repede au trecut toți acești ani iar acum, uitându-mă înapoi, retrăiesc cu emoție toate momentele deosebite care mi s-au întâmplat pe toată perioada studenției, de la studiile de licență până la cele de doctorat. Fiind acum în poziția de a-mi prezenta teza de doctorat, îmi doresc să adresez câteva cuvinte de mulțumire celor care m-au îndrumat, m-au sprijinit și au contribuit în mod semnificativ la dezvoltarea mea profesională.

Primele gânduri se îndreaptă către coordonatorii mei științifici, doamna *prof. dr. ing. Anca Ioana Nicolau* și domnul *prof. dr. David Rodríguez-Lázaro*, cărora le mulțumesc pentru permanenta lor îndrumare, sprijinire și încurajare de-a lungul perioadei de pregătire a doctoratului și de elaborare a tezei. Doresc să îmi exprim recunoștința față de doamna profesor *Anca Ioana Nicolau*, care mă călăuzește încă din al doilea an de licență, pentru profesionalismul dumneai, pentru răbdarea și îndrumarea științifică constantă. Dacă nu ar fi fost dumneai, nu aș fi devenit ceea ce sunt astăzi.

În egală măsură, doresc să îi mulțumesc domnului *prof. dr. David Rodríguez-Lázaro*, unul dintre microbiologii de top din Europa, cel care m-a introdus în ramura legată de rezistența bacteriilor la antibiotice, pentru modul în care m-a motivat, pentru cunoștințele transmise și pentru abordările inovatoare sugerate în cercetarea mea îi sunt profund recunoscătoare. A fost o mare onoare pentru mine să lucrez cu domnia sa.

În aceeași măsură, adresez mulțumiri deosebite doamnei *prof. dr. Marta Hernández* pentru facilitarea înțelegerii tehnicilor de biologie moleculară utilizate în microbiologia alimentară și pentru toate sfaturile constructive oferite pe perioada cercetării mele.

Doresc să îmi exprim gratitudinea față de membrii comisiei de evaluare a lucrării: doamna *prof. dr. ing. Daniela Borda*, doamna *prof. dr. ing. Gabriela Bahrim* și doamna *conf. biol. Vasilica Barbu*, pentru sfaturile și sugestiile oferite dar și pentru diferitele perspective de extindere a cercetării experimentale.

Aș dori, de asemenea, să le mulțumesc celor cu care am lucrat, atât la *Universitatea „Dunarea de Jos“ din Galați* (România), cât și la *Universidad de Burgos* (Spania) pentru sfaturile și sprijinul acordat pe toată perioada cercetării. Mulțumesc în mod deosebit doamnei *lector dr. ing. Iulia Bleoancă* și doamnei *ing. Gabriela Gavrilă*, pentru sfaturile prietenoase pe care mi le-au oferit.

Tuturor colegilor mei din laborator: *Andrei, Narciso și Florentina*, le datorez mulțumiri, pentru nopțile albe petrecute înainte de orice deadline al vreunei lucrări. Mulțumesc lui *Bernar, David, Jaime, Lorena, Patricia, Julian, MariCruz și Raul* pentru prietenia arătată la ITACyL, „a doua mea casă”. Mulțumesc *Monicăi, lui Nicole, Gislainei, lui Zoe, Marielei* și nu în ultimul rând, îi mulțumesc *Alinei*, pentru sprijinul moral acordat.

În încheiere, aș dori să mulțumesc în mod special familiei mele iubite, care m-a sprijinit necondiționat pe toată perioada studiilor doctorale și care a subliniat întotdeauna importanța unei bune educații. Părinților, *Laura Felicia și Eugen*, surorii mele, *Ana Maria, bunicilor și viitorilor părinți, Andreei* și, nu în ultimul rând, celui care mă întrește, *Alexandru*.

Elena-Alexandra Oniciuc

Context actual și obiective cheie

Staphylococcus aureus este o bacterie oportunistă, căreia i se acordă un interes deosebit din cauza riscurilor de a produce infecții, a căror gravitate pot pune în pericol sănătatea omului. De-a lungul anilor, incidența acesteia a crescut în alimentele de origine animală, motiv pentru care a început să fie privită și ca agent patogen alimentar.

Pe lângă capacitatea acestei bacterii de a produce enterotoxine, motivul principal al apariției toxinfecțiilor alimentare la nivel mondial, rezistența la antibiotice constituie o altă problemă, prin tulpinile de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA).

Primele infecții stafilococice din mediul clinic au apărut la finele anilor '50, la scurt timp după introducerea medicamentelor antimicrobiene, cum ar fi penicilinele, astfel că nevoia urgentă de medicamente alternative a fost absolut necesară. La scurt timp, din cauza numărului mare de infecții stafilococice apărute, s-au introdus medicamente semisintetice alternative, cum sunt metilina și oxacilina, ce aveau să fie utilizate la scară largă. Desigur, la scurt timp după introducerea lor în terapie, au început să apară primele tulpini rezistente la metilina, acestea fiind asociate cu infecțiile nosocomiale. Rezistența la metilina este cauzată de prezența genelor *mecA* sau *mecC*, elemente centrale mobile ale casetelor cromozomiale stafilococice, ce codifică sinteza unei proteine denumită PBP2a sau PBP2', cu afinitate scăzută pentru medicamentele β -lactamice, protejând astfel sinteza peptidoglicanului și a peretelui celular bacterian față de acțiunea antibioticelor din această clasă. Cu toate acestea, determinanții ce codifică rezistența nu sunt încă clar identificați, deoarece studiile au sugerat că gena *mec* ar putea fi transmisă între tulpini de *S. aureus* și alte specii de stafilococi coagulazo-negativi. De exemplu, principalele clone epidemice de MRSA ar putea avea, la origine, un element SCC*mec*, *mecA* provenind de la tulpinile de *S. aureus* sensibile la metilina (MSSA).

La începutul anilor '90, tulpinile de MRSA au început să fie izolate din comunități, iar pentru diferențierea acestora de cele clinice (HA-MRSA), au fost denumite *community-acquired* (CA-MRSA). Recent au apărut alte tulpini noi de MRSA, cu potențial zoonotic, denumite *livestock-associated* (LA-MRSA).

Privind originea sa și numărul mare de focare cauzate, putem admite faptul că MRSA reprezintă un patogen nosocomial și alimentar relevant, pe care sistemele de sănătate publică și agențiile de siguranță alimentară, la nivel mondial, îl iau în considerare. De asemenea, până în prezent, relevanța acestuia în lanțul alimentar nu a fost pe deplin analizată, deoarece transmisia zoonotică nu a fost încă demonstrată, iar transmisia prin intermediul alimentelor nu a fost încă evidențiată.

Din ce în ce mai multe studii științifice evidențiază implicarea unor astfel de tulpini în diseminarea diferitelor linii genealogice de MRSA în lanțul alimentar. Cunoștințele actuale despre tulpinile de MRSA izolate de la animalele de la care provin materiile prime utilizate

în industria alimentară și produsele alimentare asociate demonstrează faptul că astfel de tulpini rezistente la antibiotice pot fi transmise oamenilor, de-a lungul lanțului alimentar, prin consumul alimentelor contaminate. Mai mult decât atât, excesul/utilizarea abuzivă a antibioticelor în hrana pentru creșterea animalelor și în medicina veterinară și umană ar putea contribui, de asemenea, la apariția rezistenței. Apoi, o serie de întrebări sunt adresate: Ar trebui populația să fie conștientă de posibilele riscuri emergente asociate tulpinilor de MRSA în lanțul alimentar? Care sunt consecințele, din perspectiva siguranței alimentare, în cazul în care alimentele nu au nicio trasabilitate? Ar trebui să ne așteptăm la noi mecanisme de rezistență care ar putea conduce la noi variante de MRSA?

În prezenta teză, intitulată "***Caracterizarea tulpinilor de Staphylococcus aureus metilino-rezistente izolate din produsele alimentare***", se discută recente descoperiri din literatura de specialitate cu privire la evoluția epidemiologică a tulpinilor de MRSA. În această teză, abordarea a avut ca scop investigarea prezenței MRSA în alimente confiscate de la diferiți călători care intră în Uniunea Europeană (UE) prin intermediul vamelor din aeroporturi sau a celor situate în punctele de trecere a frontierelor terestre.

În acest context, activitățile de cercetare desfășurate pe parcursul studiilor doctorale au avut ca **obiectiv principal** studiul MRSA din alimentele importate ilegal în UE. Un număr mare de călători traversează ilegal granița UE cu alimente ascunse în bagajele personale, acestea fiind ulterior confiscate de autorități în punctele de control la frontieră asociate porturilor, aeroporturilor sau frontierelor terestre. Cu o oarecare indiferență, aceștia comunică agenților vamali că produsele aduse sunt pentru consum personal, însă ajung să fie vândute ilegal (fenomen cunoscut sub numele de "contrabandă"). Deoarece nu se cunoaște originea/calitatea materiilor prime, nici procesul tehnologic și nici condițiile de igienă din timpul procesării alimentelor, aceste produse alimentare importate ilegal prezintă un risc potențial pentru sănătate. În plus, lipsa condițiilor de refrigerare și/sau a ambalajului adecvat în timpul transportului și vânzării încalcă regulile de igienă. De obicei, puține informații sunt disponibile cu privire la riscurile asociate și la prevalența agenților patogeni în aceste alimente.

Teza pune accentul pe impactul tulpinilor de *S. aureus* asociate acestor alimente asupra sănătății publice, discutând posibilele căi de transmitere ca urmare a introducerii acestor alimente în mod ilegal în spațiul UE de către călători. O situație specială, ratificată prin Legea 10/2010 ([Monitorul Oficial](#)), există în România, unde este permis micul trafic la frontieră între România și Republica Moldova. Astfel, alimentele declarate oficial pentru consum propriu sunt introduse legal în UE, dar vândute ilegal pe piețele locale din România. Chiar dacă autoritățile locale verifică deseori astfel de piețe, produsele alimentare provenind din micul trafic de frontieră sunt vândute zilnic. În acest sens, au fost analizate 210 probe prelevate dintr-o astfel de piață și probe din alimentele găsite în bagajele pasagerilor călătorind din țările non-UE și confiscate la posturile de control la frontieră din Aeroportul Internațional Bilbao, Spania, (269 produse alimentare) și de la Aeroportul Internațional Viena, Austria, (600 de produse alimentare).

În ambele cazuri, aceste produse alimentare, fie produse în casă sau industriale, au fost păstrate la temperatura camerei și adesea scoase din pachetul original. În plus, deoarece acestea au fost transportate, depozitate și vândute în condiții care facilitează creșterea agenților patogeni, ar putea reprezenta un risc crescut la adresa sănătății consumatorilor. În afară de investigarea rutelor de transmitere a tulpinilor de MRSA către UE, această teză urmărește să analizeze liniile genealogice care ar putea fi implicate prin intermediul acestor produse alimentare.

Activitățile de cercetare desfășurate pe parcursul studiilor doctorale au vizat următoarele **obiective științifice cheie:**

- ◆ Prezentarea generală a descoperirilor privind situația actuală a tulpinilor de MRSA în lanțul alimentar, subliniind necesitatea unor programe adecvate de control și prevenire și furnizarea de informații actuale pentru programele de supraveghere ale UE;
- ◆ Controlul rutelor de transmitere a MRSA prin intermediul alimentelor introduse din țările din afara UE ca bunuri personale, dar care sunt ilegal vândute consumatorilor din UE, subliniind rolul pe care aceste alimente l-ar putea avea în prevalența și diseminarea MRSA;
- ◆ Identificarea, izolarea și caracterizarea tulpinilor de MRSA pe baza tehnicilor fenotipice și genotipice;
- ◆ Corelarea aspectelor genotipice ale tulpinilor de MRSA cu formarea și compoziția biofilmelor produse de acestea, pentru a putea îmbunătăți strategiile în ceea ce privește curățarea suprafețelor din fabricile de industrie alimentară sau a evita episoadele de contaminare încrucișată;
- ◆ Investigarea bazată pe secvențierea genomului complet (WGS) în vederea identificării factorilor de virulență și a genelor asociate cu rezistența la antibiotice a unei tulpini susceptibile la oxacilină (OS)-MRSA;
- ◆ Evaluarea mediilor cromogenice disponibile în comerț pentru confirmarea MRSA din probe provenite de la om, animal și aliment;
- ◆ Integrarea rezultatelor obținute în prezenta teză în cadrul studiilor la nivel mondial, axate pe diseminarea diferitelor linii genealogice ale MRSA, împreună cu informațiile necesare pentru înțelegerea riscurilor potențiale pe care MRSA le poate reprezenta.

Cercetarea oferită în teza de față nu ar fi fost posibilă fără o strânsă comunicare între instituțiile de cercetare din România, Spania, Portugalia sau Austria, atât în cadrul proiectului PROMISE FP7, cât și dincolo de acesta.

Sumar

Prezenta teză de doctorat cuprinde un total de 250 de pagini, inclusiv 28 figuri și 20 tabele. Pentru o bună gestionare și reprezentare a rezultatelor, a fost împărțită în cinci părți, după cum urmează:

În **Partea I** se discută despre *S. aureus* ca agent patogen alimentar într-un context general. Pentru aceasta, partea I a fost la rândul ei împărțită în două capitole. **Capitolul 1**, intitulat ***Staphylococcus aureus and Its Main Characteristics*** (*Staphylococcus aureus și principalele lui caracteristici*) prezintă date recente din literatura de specialitate despre *S. aureus*, trecând de la istoric, taxonomie, distribuție și transmitere, până la cerințele necesare pentru creștere și metabolismul acestuia. Mai mult decât atât, în acest capitol sunt prezentați factorii asociați cu aderența, producerea de exotoxine și exoenzime sau alți factori asociați cu rezistența la antibiotice a bacteriei *S. aureus*. În același timp, sunt prezentate caracteristicile diferitelor linii genealogice de MRSA izolate din ferme, ferme de animale, produse alimentare și oameni, comentariile concentrându-se asupra prezenței MRSA în animalele de la care se obțin alimente (materii prime pentru industria alimentară) și produsele asociate.

Capitolul 2 descrie ***Procedures Used for Detection and Identification of S. aureus*** (*Proceduri utilizate pentru detecția și identificarea bacteriei S. aureus*) începând cu metode convenționale și terminând cu tehnici de biologie moleculară, cum ar fi secvențierea totală a genomului. O atenție deosebită este acordată mecanismelor de decodare implicate în exprimarea fenotipică a rezistenței la meticilină în tulpinile de *S. aureus*.

Partea a II-a prezintă ***Materials, Equipments and Methods*** (Materiale, echipamente și metode). În capitolul 3 sunt prezentate informații generale privind tulpinile utilizate, mediile de cultură, enzimele, reactivii, kiturile comerciale, echipamentele și aparatele. Sunt enumerate informații cu privire la secvențierea, instrumentele bioinformatică sau baza de date utilizate. Capitolul 4 oferă informații despre strategia de prelevare a probelor de alimente, despre metodele de izolare, detectare și cele de confirmare a bacteriei *S. aureus*. Metodele fenotipice și genotipice utilizate pentru caracterizarea tulpinilor MRSA sunt, de asemenea, detaliate.

Partea a III-a discută rezultatele experimentale obținute în timpul stagiului doctoral și este organizată în șase capitole, după cum urmează:

Detection and Identification of Staphylococcus aureus in Food Isolated from Markets (*Detecția și identificarea bacteriei Staphylococcus aureus izolată din produse alimentare provenite din piețe*) este prezentată în Capitolul 5. Acesta este capitolul în care este evaluată prezența MRSA în alimentele vândute ilegal pe piața din Galați. Acest studiu evidențiază prezența unei tulpini cu potențial zoonotic (LA)-MRSA izolată dintr-un produs de origine animală, ceea ce constituie o dovadă că alimentele pot reprezenta o cale de transmitere la

oameni. Astfel de tulpini au intrat în atenția cercetătorilor datorită apariției lor rapide și epidemiologiei diferite. Acest studiu este important, în special, pentru autoritățile din domeniul siguranței alimentare, în vederea elaborării de planuri de supraveghere și control.

Capitolul 6 intitulat ***Compositional Analysis of Biofilms Formed by Staphylococcus aureus Isolated from Food Sources*** (*Analiza compoziției biofilmelor formate de tulpini de S. aureus izolate din surse alimentare*) investighează capacitatea unor astfel de tulpini de a forma biofilme, precum și compoziția acestora din urmă. Acest studiu evidențiază abundența proteinelor ca fiind implicate în menținerea structurii biofilmelor formate de *S. aureus* izolate din surse alimentare. Compoziția biofilmelor trebuie să fie cunoscută atunci când sunt dezvoltate noi soluții care sunt alese pentru combaterea biofilmelor, atât în industria alimentară, cât și în medicină.

Tracking MRSA in food entering to the European Union via cross border traffic and international flights (*MRSA în alimentele care intră în Uniunea Europeană prin trafic transfrontalier și zboruri internaționale*) este titlul Capitolului 7, cel care urmărește să sublinieze încă o dată potențialele riscuri pe care aceste alimente de origine animală introduse ilegal în spațiul UE le reprezintă pentru consumatorii finali. Prezența diferitelor linii genealogice de MRSA capabile să producă enterotoxine, identificate în alimentele confiscate, poate duce la apariția unor focare cauzate de inconștiența oamenilor. În plus, izolarea unei noi variante de OS-MRSA poate constitui o problemă de siguranță alimentară, deoarece astfel de tulpini sunt diferite din punct de vedere fenotipic față de variantele clasice de MRSA.

Biofilm Formation by MRSA Isolates Recovered from Passenger's Luggage from Non-EU Flights (*Formarea biofilmelor de către izolatele MRSA recuperate din surse alimentare, din bagajele pasagerilor care au efectuat zboruri din țări care nu sunt membre ale UE*) este descrisă în Capitolul 8. Prin corelarea informațiilor adunate în capitolul precedent și a capacității acestora de a forma biofilme, putem pune în evidență dacă există o legătură între formarea biofilmului și compoziția acestuia cu caracteristicile sale moleculare. Managerii în siguranța alimentelor, care lucrează fie în industria alimentară, fie în bucătăriile industriale, își pot baza planurile de siguranță pe astfel de studii.

Case study- Oxacillin-Susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus Associated to Processed Food in Europe (*Studiu de caz- Susceptibilitatea la oxacilină a S. aureus mecA pozitiv asociat cu produse alimentare europene*) este prezentat în Capitolul 9. Problema acestor tulpini a fost descrisă, pentru prima dată, prin secvențierea întregului genom, în care factorii genetici esențiali în vederea exprimării rezistenței la meticilină în *S. aureus* este examinată, prin identificarea mecanismelor care conferă susceptibilitatea la oxacilină.

Capitolul 10 prezintă ***Chromogenic Media Evaluation for Confirmation of MRSA Isolated from Humans, Animals and Food Samples*** (*Evaluarea unor medii cromogene pentru confirmarea tulpinilor de MRSA izolate din mediul clinic, animale și alimente de origine animală*). Au fost comparate două medii cromogene pentru confirmarea MRSA- Brilliance MRSA 2 Agar (ThermoFisher Scientific) și ChromID MRSA (bioMérieux). Astfel de medii

sunt utile în industria alimentară atunci când se realizează controlul microbiologic al alimentelor, deoarece acestea permit detectarea rapidă a tulpinilor prezumtive de MRSA.

Partea a IV-a cuprinde *General Discussion* (*Discuții generale*). Această parte este bazată pe rezultatele obținute și comunicate comunității științifice internaționale. Rezultatele prezentate în teza actuală evidențiază riscul potențial pe care diseminarea și prevalența MRSA îl reprezintă pentru consumatori dacă măsurile de igienă lipsesc. Perspectivele viitoare privind transmiterea și epidemiologia MRSA, în contextul siguranței alimentare, pot oferi o mai bună înțelegere a rutelor de transmitere în Europa (aeroporturi internaționale și piețe apropiate granițelor UE), a modului în care se poate diminua impactul economic asociat tratamentelor medicale asupra comunității UE, precum și a măsurilor pe care industria alimentară ar trebui să le ia pentru a evita formarea biofilmelor.

Partea a V-a sintetizează rezultatele întregii cercetări în partea de *Concluding Remarks* (*Concluzii*). Contribuțiile originale aduse de prezenta teza sunt subliniate, împreună cu perspectivele de continuare a cercetărilor.

CAPITOL 1

Staphylococcus aureus

S. aureus este una dintre cele mai cunoscute și studiate bacterii din genul său. Este o bacterie oportunistă care afectează omul și animalele, iar virulența sa depinde de mai mulți factori asociați cu proteinele extracelulare, contribuind la infecții cutanate, intoxicații alimentare sau chiar boli (Haveri *et al.*, 2007). Patogenitatea bacteriei *S. aureus* (Figura 1.1) se caracterizează prin producerea de enzime specifice (coagulază, catalază, termonuclează, hialuronidază) și exotoxine. Tulpinile de *S. aureus* pot conține diferite gene de virulență care codifică enterotoxinele stafilococice (SEs), leucocidinele, exfoliații, toxina 1 a sindromului șocului toxic (TSST-1), alelele reglatoare ale genelor accesorii și rezistența la antibiotice (Spanu *et al.*, 2012).

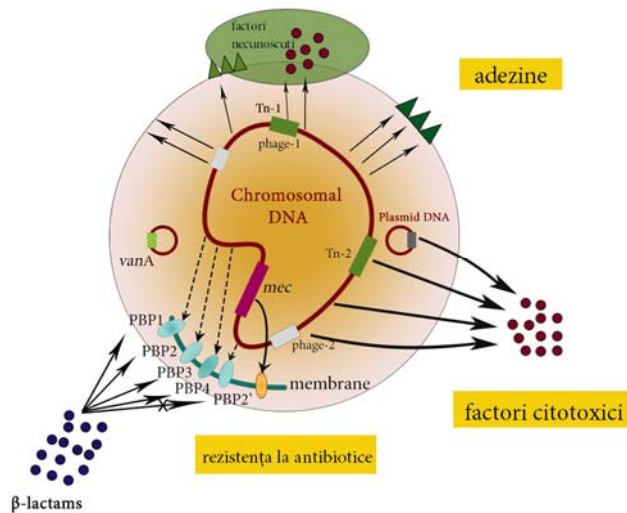


Figura 1.1. Factori de virulență prezenți în bacteria *Staphylococcus aureus*

Mai mult, componentele de adeziune ale peretelui celular (CWA) (adezine, proteina A, acid teichoic, peptidoglican) sunt de asemenea implicate în virulență (Gordon and Lowy, 2008).

Staphylococcus aureus metilino-rezistent

Rezistența la peniciline a bacteriei *S. aureus*, denumită și "rezistență la metilino" sau "rezistență la oxacilină", se manifestă ca rezistență la toți agenții β-lactamici, incluzând cefalosporinele și carbapenemii, și susceptibilitate potențială la cea mai recentă clasă de cefalosporine active (de exemplu, ceftarolina). MRSA poate fi transmis în mai multe moduri, astfel că epidemiologia este complicată; numeroase agenții de sănătate publică, cât și diverse agenții de siguranță alimentară sunt implicate (Figura 1.2).

De asemenea, MRSA a fost izolat din produsele alimentare, implicând alimente ca o cale de transmitere a acestor tipuri de tulpini către consumatorul final.

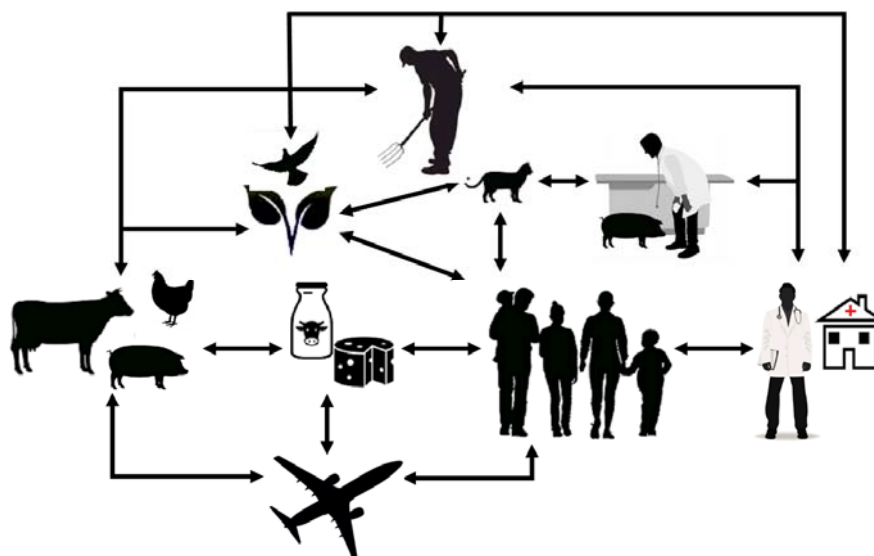


Figura 1.2. Rute potențiale de transmitere a tulpinilor de MRSA

CAPITOL 2

Proceduri utilizate pentru detecția și identificarea bacteriei *Staphylococcus aureus*

2.1. Metode convenționale de detecție și identificare

ISO 6888 descrie două metode orizontale (partea 1 și partea 2) (Figura 2.1) pentru enumerarea tulpinilor stafilococice coagulazo-pozitive. În general, poate fi utilizată partea 1 din standardul ISO 6888, dar, în cazul produselor alimentare (cum ar fi brânzeturile din lapte crud și anumite produse din carne neprocesată) care ar putea fi contaminate cu stafilococi și ar putea forma colonii atipice pe mediul Baird-Parker cu agar sau care ar avea o floră mixtă prin care coloniile nu ar putea fi distinse, este preferabil să se utilizeze procedura descrisă în partea 2 (cea în care se folosește fibrinogenul plasmatic de la iepure) (ISO 6888).

În prezent, diagnosticul rapid de laborator este esențial pentru tratarea, gestionarea și prevenirea MRSA (Kumar *et al.*, 2013; Malhotra-Kumar *et al.*, 2010). Din acest motiv, au apărut diferite medii cromogene pentru detectarea MRSA, cum ar fi agar Brilliance MRSA (Oxoid), ChromID (bioMérieux), HardyCHROM™ MRSA (Hardy Diagnostics), MRSASelect (BioRad) sau BBL-CHROMagar (BD Diagnostics).

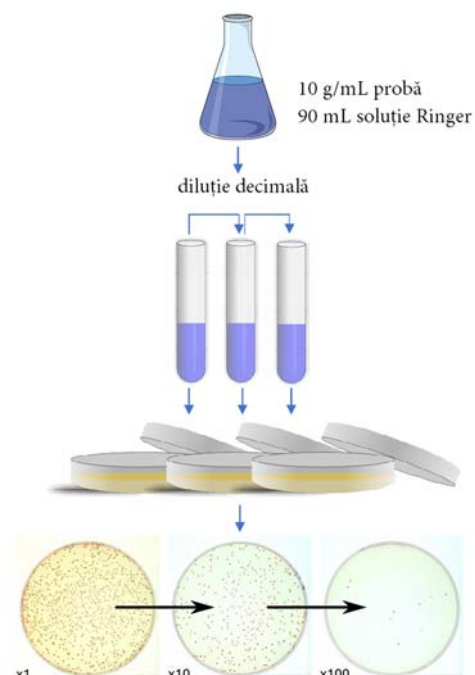


Figura 2.1. Metoda orizontală pentru enumerarea stafilococilor coagulazo-pozitivi (*S. aureus* și alte specii)

2.2. Metode de caracterizare genetică

În prezent, metodele de caracterizare genetică sunt utile pentru a clasifica izolatele și pentru a compara caracteristicile genetice relevante ale fiecărei clone. Dintre aceste metode, amintim electroforeza în gel în câmp pulsatoriu (PFGE), tipizarea prin secvențierea locilor (MLST), metoda *spa* sau metoda de caracterizare a casetei cromozomiale *mec* (SCC*mec*).

Reacția de polimerizare în lanț. Metodele moleculare bazate pe reacția de polimerizare (PCR) au fost dezvoltate de mai bine de două decenii și aplicate pentru a studia genetica populației și epidemiologia moleculară a agenților patogeni alimentari (Oyarzabal and Kathariou, 2014).

Electroforeza în gel în câmp pulsatoriu. Metoda cea mai răspândită de tipizare moleculară a tulpinilor de MRSA este PFGE, o tehnică bazată pe digestia ADN-ului bacterian cu ajutorul unei enzime de restricție *Sma*I, ulterior fiind separată în fragmente mari în funcție de mărimea lor atunci când sunt supuse migrării într-un gel de agaroză.

Tipizarea prin secvențierea locilor. Este o metodă de subtipare bazată pe secvențe de ADN, dezvoltată în anul 2000 (Enright *et al.*, 2000), pentru compararea secvențelor interne (fragmente interne de 450-500 bp) a celor șapte gene housekeeping distribuite în diferiți loci din jurul cromozomului de *S. aureus* (www.mlst.net/).

Metoda *spa*. Metoda dezvoltată în anul 1996 pentru *S. aureus* se bazează pe detectarea regiunii polimorfe X a genei care codifică proteina de suprafață A (*spa*) (Oyarzabal and Kathariou, 2014). Repetărilor li se atribuie un cod numeric, iar tipul *spa* se deduce din ordinea repetițiilor specifice (spaserver.ridom.de/).

Metoda de caracterizare a casetei cromozomiale *mec* (SCC*mec*). Tulpinile de MRSA sunt caracterizate de prezența unui element genetic heterogen mobil, numit SCC*mec*, care posedă genele *mecA* sau *mecC*, elementul central al rezistenței la meticilină (Milheiriço *et al.*, 2007; Paterson *et al.*, 2014a; Petinaki and Spiliopoulou, 2012).

Secvențierea genomului bacterian. În prezent, această metodă se dovedește a fi utilă nu numai pentru identificarea elementelor de transfer orizontale ale genei sau ale altor secvențe genetice care reglează expresia factorilor de virulență (Alföldi *et al.*, 2013), dar contribuie, de asemenea, la înțelegerea caracteristicilor structurale care pot contribui la variații în rearanjarea genomică sau modificări în repertoriul genei (Castillo *et al.*, 2016). Mai mult decât atât, mecanismele care conduc la mutații din cauza proteinelor nefuncționale (Chua *et al.*, 2013) sunt de o mare importanță, deoarece pot expune diferite particularități asupra evoluției acestor tulpini.

CAPITOL 3

Materiale și echipamente

Materialele utilizate în această teză de doctorat au fost furnizate de către Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați, România, Universitatea din Burgos și Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y Leon, Spania, Institutul de igienă a laptelui, Austria, și Centro de Engenharia Biologica, Braga, Portugalia.

CAPITOL 4

Metode

Strategia de prelevare a probelor de alimente

Un total de 1079 de produse alimentare prelevate în perioada August 2012-Iulie 2015 au fost testate pentru prezența bacteriei *S. aureus*, în special MRSA. Produsele alimentare au fost fie confiscate de către autoritățile de frontieră la posturile de inspecție la frontiera cu UE de la Aeroportul Internațional Bilbao, Spania, (269 de produse alimentare), cât și de la Aeroportul Internațional din Viena, Austria, (600 de produse alimentare), sau au fost prelevate de pe o piață din Galați, România, unde alimentele provenite din micul trafic de frontieră dintre Republica Moldova și România (Giurgiulești-Galați) (210 de produse alimentare) sunt vândute.

Rezultatele globale privind identificarea, izolarea și caracterizarea tulpinilor de *S. aureus*, în special tulpinile MRSA, au fost obținute prin abordarea metodelor fenotipice și genotipice.

CAPITOL 5

Detecția și identificarea bacteriei *Staphylococcus aureus* izolată din produsele alimentare provenite din piețe

În acest studiu am evaluat prezența tulpinilor de MRSA izolate din produsele alimentare (realizate în casă și/sau procesate) vândute ilegal pe o piață din Galați, un oraș situat în partea de sud-est a României, la granița cu Republica Moldova.

Aceste informații oferă o imagine de ansamblu asupra riscului potențial generat de produsele alimentare (alimente introduse ca bunuri personale, care sunt apoi vândute ilegal către consumatorii din UE) introduse în Uniunea Europeană (UE) din țări din afara UE, definind astfel o rută de transmitere a acestor tulpini, cât și rolul pe care îl poate juca în prevalența și diseminarea tulpinilor de MRSA.

Rezultate și discuții

Apariția tulpinilor de MRSA în cazul alimentelor provenite de la animale a creat o mare îngrijorare în ultimul deceniu cu privire la rolul potențial al alimentelor în diseminarea liniilor genealogice de MRSA. În consecință, mai multe studii au evaluat prezența acestui agent patogen în fabricile de procesare ale alimentelor cât și ale produselor de origine animală provenite din diferite țări. Prevalența tulpinilor de MRSA în produsele alimentare variază în mare măsură în funcție de animal și țara de origine. Astfel, în timp ce rata ridicată de contaminare din SUA și Canada a fost cauzată de carnea de porc, în cazul țărilor ca Olanda și Danemarca principala cauză a fost reprezentată de păsările crescute în gospodării (Kluytmans, 2010; Bhargava *et al.*, 2011).

Cele 200 de probe de alimente prelevate, fie home-made, fie procesate, au fost analizate în vederea detecției și identificării tulpinilor de *S. aureus*, respectiv a tulpinilor de MRSA.

Global, 73% din probele analizate au fost făcute de casă și vândute în pungi de plastic sau cutii de carton, în timp ce 27% au fost produse la nivel industrial, ulterior fiind ambalate și etichetate. În total, 80% din alimente provin din Republica Moldova, 17% din Ucraina și 3% din Bulgaria.

În ansamblu, 32 de tulpini *S. aureus* au fost izolate din 16 probe de alimente confiscate (8%): 8 probe din categoria lapte și produse lactate, 5 probe din categoria pește și produse din pește și trei probe de carne. Dintre tulpinile analizate, un izolat (0,5%) a fost MRSA, recuperat dintr-o probă de șorici de porc, având ca determinant de rezistență gena *mecA*. Niciun izolat nu a cuprins omologul *mecC*. Aceste rezultate sunt în concordanță cu alte studii în care ratele de izolare a bacteriei *S. aureus* din probele de alimente de origine animală au variat între 10% și 40% (Normanno *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2009; Crago *et al.*, 2012). Durata de depozitare/temperatură și răcirea necorespunzătoare sau tratamentul termic al produselor alimentare în restaurante, cantine sau gospodării particulare au fost responsabile pentru apariția epidemiilor cauzate de bacteria *S. aureus* (EFSA and ECDC 2014; Hennekinne *et al.*, 2012). Un studiu recent a raportat o prevalență de 27% pentru *S. aureus* la o instalație de procesare a alimentelor gata de consum, în care *S. aureus* a fost izolat din alimente pre-și post-gătite, suprafețe, mănuși ale muncitorilor și aer (Syne *et al.*, 2013).

S. aureus ar putea fi, de asemenea, izolat de la rumegătoare afectate de mastită subclinică (Voelk *et al.*, 2014; Walcher *et al.*, 2014). Brânzeturile din lapte de casă crud, produse în loturi mici, așa cum sunt investigate în acest studiu, sunt adesea contaminate cu această bacterie (Rosengren *et al.*, 2010). Studiile privind prevalența bacteriei *S. aureus* în produsele din pește sunt rare, deși 7% din toate toxiinfecțiile alimentare se datorează peștelui și produselor din pește contaminate. Două studii recente au raportat apariția tulpinilor de *S. aureus* în 5-43% din probele de pește și produse din pește analizate (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012; Zarei *et al.*, 2012). Valorile de contaminare produse de *S. aureus* de la 10^4 la 10^5 CFU/g sunt suficiente pentru a produce enterotoxine la un nivel care

prezintă un risc pentru sănătatea consumatorilor (EC 2073/2005). În studiul nostru, doar 13% din probele alimentare de origine animală analizate, aveau $>10^5$ CFU/g contaminare cu *S. aureus*, în timp ce majoritatea aveau valori cuprinse între 10^2 și 10^4 CFU/g (Tabelul 5.1).

Opt tulpini de *S. aureus* posedă gene ce codifică enterotoxina de tip A, în timp ce alte cinci tulpini au fost descoperite pozitive pentru genele *seg* și *sei*. Restul izolatelor de *S. aureus* au fost descoperite ca fiind negative în ceea ce privește prezența enterotoxinelor. Cu toate acestea, izolatul MRSA recuperat din proba de șorici de porc nu a fost enterotoxigenic. Apariția enterotoxinelor stafilococice constituie o problemă majoră în cazul laptelui și produselor lactate, deoarece acestea se găsesc în proporție mai mare decât restul produselor alimentare de origine animală (Carfora *et al.*, 2015). Interesant, SE au fost predominant prezente în probele de lapte și produsele lactate analizate, conținând una sau două gene care codifică rezistența la enterotoxine.

O altă problemă asociată cu creșterea animalelor este creșterea numărului de tulpini MRSA (Haran *et al.*, 2012). În afară de efectivele de lapte ca rezervor pentru MRSA, carnea brută ar putea, de asemenea, să fie contaminate în cantități mari cu *S. aureus* (15-65%), dintre care 1-11% să fie MRSA (Bhargava *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2013).

Tabelul 5.1. *Staphylococcus aureus* prezent în probele analizate de origine animală, vândute ilegal pe o piață din România

Sursa	Data izolării	Gramaj (g)	ISO 6888-2
Caviar negru	14.09.2012	150	$1.1 \cdot 10^3$
Caviar roșu	14.09.2012	150	$2.0 \cdot 10^2$
Brânză proaspătă de vaci	14.09.2012	1000	$1.5 \cdot 10^4$
Telemea de oaie	14.09.2012	1000	$1.4 \cdot 10^3$
Brânză nefermentată, de capră	14.09.2012	500	$3.5 \cdot 10^3$
Lapte proaspăt	14.09.2012	2000	$1.1 \cdot 10^4$
Somon afumat	14.09.2012	500	$1.0 \cdot 10^5$
Conservă de pește, cu ierburi	06.11.2012	1000	$1.0 \cdot 10^3$
Șorici de porc	06.11.2012	400	$2.3 \cdot 10$
Lapte proaspăt	06.11.2012	2000	$1.5 \cdot 10^2$
Brânză nefermentată, fără sare, de oaie	06.11.2012	600	$1.6 \cdot 10^4$
Pește afumat	06.11.2012	500	$1.1 \cdot 10$
Carne de pasăre	06.11.2012	2400	$3.1 \cdot 10^3$
Brânză de capră	29.01.2013	500	$2.6 \cdot 10^3$
Zer	04.02.2013	250	$1.7 \cdot 10^5$
Carne de pasăre	07.02.2013	1100	$6.6 \cdot 10^3$

Caracterizarea genetică a tuturor celor 32 de izolate *S. aureus* cu ajutorul enzimei de restricție *SmaI*-PFGE a furnizat un model constând în 13-17 fragmente de ADN cu dimensiune cuprinsă între 20-670 kbp, aproximativ. S-au observat 12 genotipuri, rezultând

un indice de diversitate Simpson de 0,909 (CI 95% 0,854-0,963), dar fără să fie observată vreo relație între pulsotip și tipul de probă sau data confiscării.

În unele cazuri, izolatele obținute din aceeași probă au prezentat diferite pulsoturi, deși cele mai multe dintre ele au fost strâns legate (Figura 5.1). Cinci izolate, incluzând izolatul MRSA, nu au putut fi tipizate de către enzima *SmaI* PFGE, sugerând că acestea aparțineau ST 398, deoarece anterior s-a demonstrat că această secvență prezintă o rezistență neobișnuită la digestia genomului de către *SmaI* (Chung *et al.*, 2000). Într-adevăr, caracterizarea suplimentară a izolatului MRSA a confirmat faptul că aparține ST398, cu SCC*mec* tip V și prezintă rezultat negativ la testul pentru prezența genelor PVL.

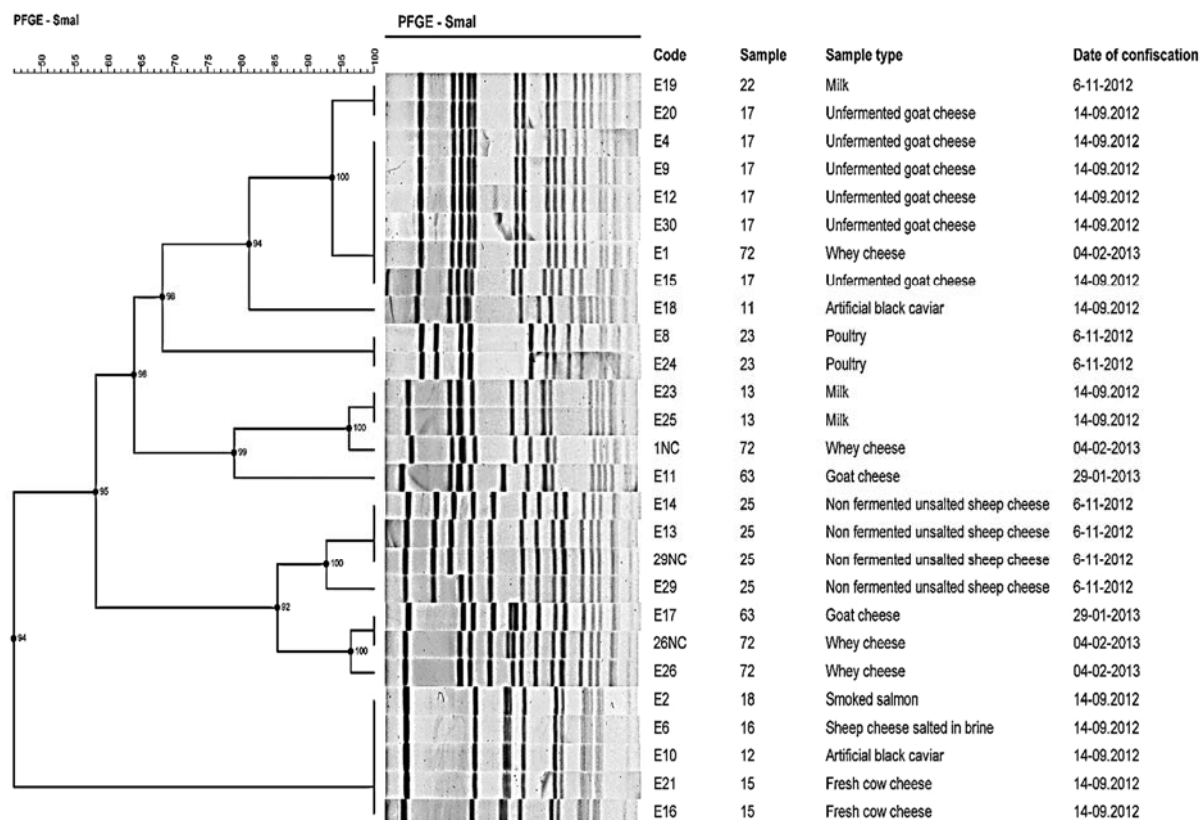


Figura 5.1. Relații genetice între 27 de izolate *S. aureus* bazate pe compararea profilurilor PFGE obținute cu ajutorul enzimei de restricție *SmaI*. Izolatele au fost observate în cele 200 de probe analizate, pe o piață din România, Iulie 2012-Martie 2013. Dendrograma a fost realizată utilizând o matrice de coeficienți de similaritate Dice cu metoda UPGMA. Scala indică valori de similitudine

Tiparea *spa* a celor 16 tulpini de *S. aureus* a condus la următoarele profile prezentate în ordine descrescătoare în funcție de frecvența de izolare din acest studiu: t449, t304, t1606, t524, t011, t91, t3625 și t803 (Tabelul 5.2). Dintre acestea, t449, t304 și t524 au fost cel mai des izolate din brânzeturile de vacă, de ovine și de capră contaminate cu 10^3 - 10^5 CFU/g, indicând o contaminare la nivelul efectivului sau a lipsei condițiilor igienice în timpul procesării și manipulării alimentelor.

De asemenea, manipularea incorectă a alimentelor ar putea fi legată de izolarea *S. aureus* t449 în cazul probei de caviar roșu și diferitelor tipuri de brânzeturi, prelevate la aceeași

dată. Aceeași observație ar putea fi făcută pentru *S. aureus* t1606 izolat din probele de pește prelevate în aceeași zi.

S. aureus t011 și t3625, ambele legate de CC398 asociate animalelor, au fost izolate din carne de porc și pasăre. Un alt tip de *spa*, foarte frecvent izolat, t011, se găsește deseori ca fiind rezistent la metilino (www.spaserver.ridom.de). *S. aureus* t011, t304, t524, and t091 sunt legate de colonizare și apariția infecțiilor umane. Aceste date indică riscul la care este supus consumatorul final, datorită vânzării produselor alimentare fără precauții de igienă și a statutului de agent patogen necunoscut cât și a manipulării produselor alimentare neambalate pe o piață deschisă.

Tabelul 5.2. Tiparea *spa* typing a celor 16 tulpini de *Staphylococcus aureus* izolate din produse alimentare, vândute ilegal pe o piață din România

Tulpină	Data izolării	Tipul <i>spa</i>	Sucesiune repetitivă	Sursa	Frecvență ^a	Asociere
E10	14/09/2012		26-23-13-	Caviar roșu		
E16	14/09/2012	t449	23-31-05- 05-17-25-	Brânză proapătă de vaci	0.03%	MSSA/MRSA (colonizare)
E6	14/09/2012		17-25-16-	Telemea de oaie		
E2	14/09/2012		28	Somon afumat		
E4	14/09/2012	t304 (ST6,	11-10-21- 17-34-24-	Brânză nefermentată, de capră	0.33%	MSSA/MRSA (colonizare, infecție)
E19	06/11/2012	ST8)	34-22-25	Lapte proaspăt		
E1	04/02/2013			Zer		
E3	06/11/2012	t1606	08-16-34- 34-24-25	Conservă din pește, cu ierburi	0.01%	MRSA (colonizare)
E7	06/11/2012			Pește afumat		
E13	06/11/2012	t524	04-17	Brânză nefermentată, fără sare, de oaie	0.03%	MRSA (infecție)
E11	29/01/2013			Brânză de capră		
E22	06/11/2012	t011	08-16-02- 25-34-24- 25	Șorici de porc	3.28%	MRSA (colonizare, infecție), CC398
E18	14/09/2012	t091 (ST7)	07-23-21- 17-34-12- 23-02-12- 23	Caviar negru	0.90%	MSSA/MRSA (colonizare, infecție)
E5	07/02/2013	t3625	08-16-34- 25	Carne de pasăre	0.01%	MSSA, CC398
E8	06/11/2012	t803 (ST15)	07-23-02- 12-23	Carne de pasăre	0.06%	MSSA/MRSA (colonizare)

08-21-17-

E23 14/09/2012 unknown 36-34-34- Lapte proaspăt - -
34-33-34

Notă: ^a Această informație este susținută de Ridom Spa Database (www.spaserver.ridom.de)

Mai mult, testarea sensibilității la antibiotice a evidențiat cinci profiluri de rezistență (Tabelul 5.3). În general, 19 tulpini (59,4%) au fost sensibile la toate antibioticele testate. Cu toate acestea, izolatul MRSA a fost, nu numai rezistent la toate antibioticele din clasa β -lactam, ci și la ciprofloxacina, tetraciclina și cefazolin. Dintre tulpinile *S. aureus* sensibile la meticilina (MSSA), 9 tulpini (28,1%) au fost rezistente la penicilina, 3 tulpini (9,7%) la tetraciclina și o tulpină (3,2%) la ciprofloxacina (Tabelul 5.3).

Tabelul 5.3. Profilurile de rezistență pentru cele 32 de izolate *Staphylococcus aureus* izolate din probele de alimente vândute ilegal pe o piață situată în sud-estul României, 2012-2013

Profil de rezistență	Antibiotic ^a	Izolată	%
RP0	-	19	59.4
RP1	PEN	9	28.1
RP2	TET	2	6.3
RP3	TET, CIP	1	3.1
RP4	β -lactam, TET, (CIP)	1 ^b	3.1

Notă: PEN, penicilina; TET, tetraciclina; CIP, ciprofloxacina;

^a parantezele indică rezistență intermediară;

^b izolat MRSA.

Un procent relativ scăzut de alimente a fost contaminat cu *S. aureus* (8%), iar un singur izolat a fost MRSA (0,5%); ST398-MRSA-V. Totuși, acest izolat a fost rezistent la mai multe antibiotice, nu numai la cele din clasa β -lactamelor, ci și la celelalte trei antibiotice utilizate pe scară largă în chimioterapie (Tabelul 5.3). Tulpinile de MRSA izolate din alimentele de origine animală nu sunt neapărat legate de cel prezent în animalul de origine deoarece alte două tipuri de linii genealogice pot fi găsite în alimente: MRSA asociat comunității (CA-MRSA) prezent în alimente din cauza unei surse umane de contaminare prin manipularea necorespunzătoare sau LA-MRSA prin contaminarea carcaselor în timpul sacrificării animalelor cu tulpini MRSA pozitive.

Interesant este faptul că, în timp ce majoritatea studiilor europene au raportat prezența clonei ST398 a LA-MRSA în diverse alimente de origine animală (de Boer *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2009) cum ar fi studiul de față, se pare că prezența acestei clone lipsește în SUA și Canada, unde, în schimb, se găsesc clonele asociate comunităților (Bhargava *et al.*, 2011). Rezultatele unui studiu recent de monitorizare a prezenței MRSA în produsele alimentare importate ilegal, confiscate pasagerilor din afara UE pe un aeroport spaniol, reprezintă, de asemenea, o rută de transmitere a MRSA către UE; MRSA obținut a fost din continentul sud-american (Bolivia) și a aparținut celor două clone ale CA-MRSA (ST8 și ST1649) (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015).

În ambele cazuri, se pare că alimentele joacă un rol în diseminarea clonelor CA- sau LA-MRSA în populația generală. Într-adevăr, au fost raportate epidemii de infecție cu MRSA (Kluytmans *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2002), iar rolul alimentelor în prevalența tulpinilor de MRSA a fost demonstrat (Ogata *et al.*, 2012). În acest sens, există un consens general în care ruta de transmitere de la mediul înconjurător la spital implică nu numai oamenii și bacteriile din mediul înconjurător, ci și animalele și produsele alimentare (González-Zorn and Escudero, 2012; Spanu *et al.*, 2012).

În concluzie, acest studiu investighează pentru prima dată prezența agenților patogeni în alimentele introduse legal de către cetățenii moldoveni în Uniunea Europeană ca bunuri personale, dar vândute ilegal în România și arată faptul că contaminarea are loc la niveluri precum cele raportate de EFSA (EFSA, 2013) pentru alimentele produse și vândute sub control oficial. Mai mult, rezultatele obținute în studiu confirmă rolul potențial al alimentelor în diseminarea liniilor genealogice MRSA și definesc produsele alimentare introduse ilegal și vândute în România ca rută de diseminare a tulpinilor de MRSA, care poate juca un rol în prevalența și evoluția clonele MRSA în comunitate. Mai mult decât atât, unele izolate de *S. aureus* codificau mai multe tipuri de enterotoxine, subliniind nevoia de metode standardizate de diagnostic care să fie luate în considerare pentru posibilele episoade de toxiinfecție alimentară. În schimb, distribuția alimentelor la un număr limitat de consumatori poate conduce, cel mai probabil, doar la apariția de cazuri sporadice.

CAPITOL 6

Analiza compoziției biofilmelor formate de tulpini de *Staphylococcus aureus* izolate din surse alimentare

Acest studiu a fost realizat pentru a evalua capacitatea tulpinilor *S. aureus* izolate din produsele alimentare de a forma biofilme pe suprafețe hidrofobe la 37°C, urmată de caracterizarea matricei de biofilm. Compoziția biofilmelor formate de tulpinile *S. aureus* pe suprafețe de polistiren a fost dedusă mai întâi folosind tratamente enzimatic și chimice și confirmată ulterior prin microscopie confocală cu laser de scanare (CLSM).

Rezultate și discuții

Glucoza și NaCl induc formarea de biofilm în tulpini clinice de *S. aureus* (Fratamico *et al.*, 2009). Măsurarea efectului de 0,4% glucoză și 4% NaCl asupra formării biofilmului ne-a permis să determinăm condițiile necesare pentru tulpinile de *S. aureus* izolate din alimente de a forma biofilme. Pentru cele mai multe tulpini, nu a existat o diferență semnificativă în mediile utilizate, indicând un grad mic de variabilitate în ceea ce privește cantitatea de biomasă produsă, dar, în ansamblu, șase tulpini (E2, E6, E8, E10, E16, E23; 37,5% > 0,4 s-au remarcat pentru formarea biofilmelor mai puternice în prezență de TSBG. Deoarece determinarea biomasei totale pe o anumită perioadă de timp este o practică obișnuită pentru caracterizarea biofilmelor și biofilmele de *S. aureus* se dezvoltă încet, în

experimentul nostru au fost folosiți și timpi de incubație prelungiți. Nu este surprinzător că, la cuantificarea biofilmului, s-a demonstrat o acumulare progresivă de biomasă în timpul perioadei analizate. Pe baza acestor constatări, au fost caracterizate biofilmele de *S. aureus* după 48 de ore de incubare.

Compozițiile biofilmelor au fost evaluate prin măsurarea capacității NaIO_4 sau proteinazei K de a dispersa biofilmele de *S. aureus*.

Deși ambele tulpini ATCC și izolatele alimentare au PNAG și proteine în matrice, proteinele predomină, având astfel un rol relevant în menținerea structurii biofilmului.

În acest sens, biomasa formată de tulpinile de *S. aureus* izolate din alimente a fost redusă cu 60-70% când s-au utilizat agenți anti-proteici, în timp ce o reducere de 20-49% a fost obținută în prezența agentului anti-polizaharid (Tabelul 6.1). Tratatamentul cu proteinază K a îmbunătățit dispersia biofilmelor formate de *S. aureus* Bap-pozitive, așa cum se arată în studiul lui Shukla și Rao (2013). Efectele de dezagregare observate la biofilmele de 48 de ore au fost similare pentru toate izolatele provenite din surse alimentare.

Tabelul 6.1. Reducerea biomasei biofilmelor de *S. aureus* atunci când se utilizează metaperiodat sau proteinază K

Tulpini de <i>S. aureus</i>	Reducere în biomasă, %	
	cu NaIO_4	cu proteinază K
E2	23 ± 10.34	71 ± 4.1
E6	34 ± 2.74	71 ± 0.74
E8	46 ± 11.07	69 ± 0.63
E10	20 ± 6.51	66 ± 3.5
E16	25 ± 0.71	64 ± 1.75
E23	49 ± 3.71	67 ± 6.05
ATCC 25923	28 ± 5.25	9 ± 1.9

Notă: Biofilmele preformate au fost tratate cu NaIO_4 sau proteinază K timp de 2 ore la 37°C. Godeurile de control au fost umplute cu 0,9% NaCl. Rezultatele medii ± SD a opt godeuri pentru fiecare tulpină sunt prezentate. Experimentele au fost efectuate în triplicat. Valorile controlului negativ au fost scăzute din valorile arătate.

Diferențe au fost observate în modelul de dezagregare a biofilmului atunci când s-au comparat rezultatele obținute pentru biofilmele formate de *S. aureus* izolate din surse alimentare cu cele dezvoltate de tulpina clinică *S. aureus* ATCC® 25923, prezentând o densitate mare de clustere de celule încorporate în polizaharide. În prezent, nu există date cu referire la compoziția biofilmelor formate de *S. aureus* izolate din surse alimentare.

Literatura menționează doar despre biofilmele produse de tulpinile de *Staphylococcus* spp. izolate dintr-o instalație de prelucrare a cărnii de pasăre, care a fost descrisă de (Ferreira et al., 2014), ca având o cantitate semnificativă de exopolizaharide (EPS). CLSM în conjugare cu trei coloranți fluorescenți diferiți a fost utilizat pentru a diferenția celulele bacteriene de PNAG și proteinele din matricea biofilmului (Figurile 6.1-6.2).

Abordarea calitativă a fost preferată deoarece biofilmele obținute au fost eterogene și erau necesare mai mult de trei secțiuni pentru fiecare biofilm pentru o cuantificare semnificativă. Matricele biofilmelor formate de tulpinile *S. aureus* E8 și E10 izolate din alimente sunt reprezentate în **Figura 6.1** în comparație cu cele formate de tulpina de referință.

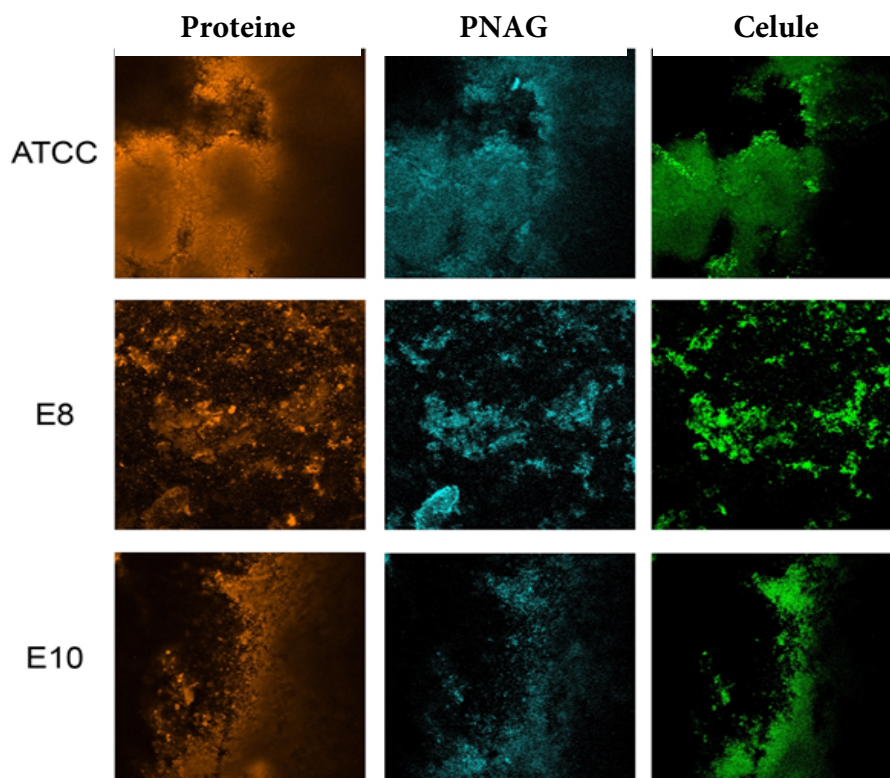


Figura 6.1. Structura matricei biofilmului obținută din observațiile de microscopie confocală a tulpinilor *S. aureus* ATCC[®] 25923, E8 izolată din proba de carne de pasăre și E10 izolată din proba de caviar roșu. Pentru fiecare biofilm este reprezentat un singur z stack

Aceste experimente au confirmat faptul că proteinele sunt de o importanță primordială pentru structura biofilmelor formate de tulpinile *S. aureus* izolate din surse alimentare, așa cum reiese din abordarea cantitativă a testelor de dezagregare a biofilmelor.

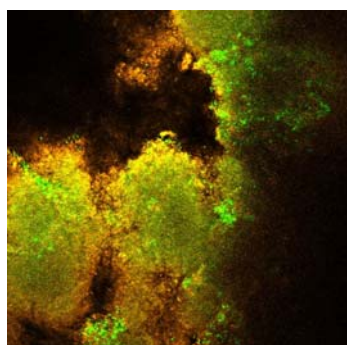


Figura 6.2. Structura biofilmului obținută prin observarea microscopică confocală a *S. aureus* ATCC[®] 25923, expusă la trei tipuri de coloranți: SYTO pentru celule, (WGA)-TRITC pentru vizualizarea polizaharidelor și SYPRO Ruby pentru proteine extracelulare. Un z-stack este reprezentat

Concluzii și perspective

Din punct de vedere fenotipic, producerea de EPS de către tulpinile *S. aureus* utilizate în studiul de față sugerează că dezvoltarea biofilmului format de stafilococ poate avea loc prin

intermediul unei căi independente *ica*. În mod evident, în populația noastră de bacterii, formarea independentă de biofilm PIA a fost mai răspândită. Cu toate acestea, pentru a determina dacă această caracteristică este importantă, în care sunt observate diferențe între biofilmele produse de tulpini izolate din surse alimentare față de cele clinice, este necesară o cercetare mai amănunțată în care o gamă mai largă de izolate alimentare ar trebui investigate.

Prezența tulpinilor de *S. aureus* care formează biofilme în mediile de procesare a alimentelor și alimente este la fel de importantă ca și în sectorul medical. Pe lângă faptul că provoacă probleme serioase de inginerie așa cum este descris de [Garrett et al. \(2008\)](#), biofilmele sunt implicate în evenimentele de contaminare încrucișată.

Matricea extracelulară proteică dezvoltată de izolatele *S. aureus* din sursă alimentară se poate comporta într-un mod similar cu cea dezvoltată de izolatele clinice de *S. aureus*, permițându-i o flexibilitate sporită și adaptabilitate pentru această bacterie în formarea biofilmelor și sprijinirea formării biofilmelor de specii mixte fie cu bacterii de degradare sau patogenă, așa cum deja s-a demonstrat ([Foulston et al., 2014](#)). Compoziția biofilmelor trebuie să fie cunoscută pentru a oferi o bază pentru elaborarea unor strategii mai bune pentru curățarea suprafețelor și evitarea contaminării încrucișate.

CAPITOL 7

MRSA în alimentele care intră în Uniunea Europeană prin trafic transfrontalier și zboruri internaționale

Puține informații se cunosc despre prevalența MRSA în produsele alimentare (de casă sau prelucrate) asociate cu comerțul internațional și cu capacitatea lor de a produce enterotoxine și rolul pe care îl pot juca alimentele de origine animală confiscate, transportate în bagajele pasagerilor care zboară din diferite părți ale globului. Datorită epidemiologiei complexe a MRSA, a fost realizat un studiu pentru a evalua dacă intrarea ilegală a alimentelor în Europa prin intermediul aeroporturilor internaționale sau al piețelor deschise aproape de granițele UE poate constitui o rută a transmiterii tulpinilor rezistente la antibiotice enterotoxigenice, în special MRSA. Informațiile obținute din acest studiu vor evidenția liniile genealogice implicate în alimente contaminate cu MRSA corelate cu enterotoxigenitatea acestora, ceea ce reprezintă o preocupare majoră pentru sănătatea consumatorilor.

Rezultate

MRSA în alimentele confiscate de către autorități

Testele microbiologice au arătat că 15,7% din produsele alimentare au fost pozitive pentru *S. aureus* ([Figurile 7.1-7.2](#)), din care 3% (26/868) au fost MRSA-pozitive (49 de izolate) care conțin gena *mecA*. Omologul *mecC* nu a fost identificat. Cu toate acestea, media aritmetică

pentru *S. aureus* a fost stabilită la $2,9 \times 10^6$ CFU/g, cu o valoare minimă de $1,00 \times 10^1$ CFU/g într-o carne de porc neprocesată, confiscată la controlul de frontieră de pe aeroportul din Bilbao de la un pasager care venea din Moscova. Cu toate acestea, numărul ridicat de CFU pentru *S. aureus* a fost de $2,45 \times 10^8$ CFU/g într-un tip de brânză necunoscut confiscată de către autoritățile de pe aeroportul din Viena de la un pasager care venea din Turcia (Figura 7.3).

Toate izolatele de MRSA au fost reprezentate de 21 de probe alimentare din categoria lapte și produse lactate (lapte de vacă, de oaie sau de capră și brânză- fie proaspătă, în saramură sau cu condimente), și 5 probe alimentare din categoria carne și produse din carne (carne neprocesată și gătită). Tulpinile de MRSA recuperate din probele pozitive de *S. aureus* confiscate la Aeroportul Internațional Bilbao au provenit din zboruri din Nigeria (1), Egipt (2), Republica Honduras (1), China (1), Nicaragua (5), Bolivia (4), Ecuador (1), Peru (2), Columbia (1) și Republica din Serbia (1). La aeroportul internațional din Viena, alimentele contaminate cu MRSA au provenit din zboruri din Egipt (3) și Turcia (2). Două probe de alimente proveneau din Republica Moldova și au făcut obiectul traficului de frontieră cu România.

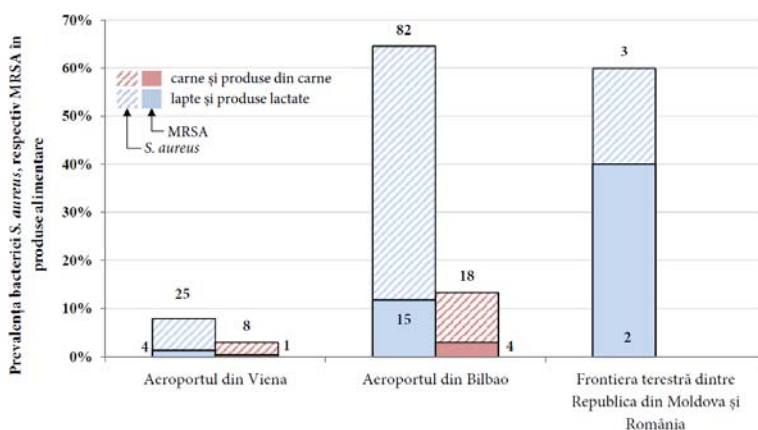


Figura 7.2. Prevalența (%) *S. aureus* în probele de alimente analizate. Coloanele solide reprezintă numărul de probe pozitive pentru MRSA, în timp ce coloanele cu dungi reprezintă numărul de izolate pozitive pentru *S. aureus*

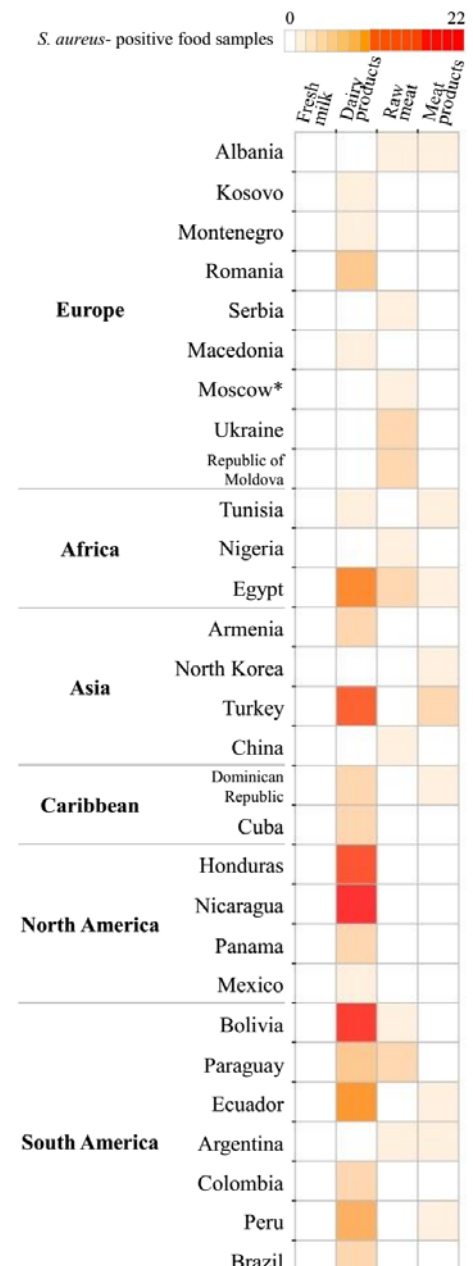


Figura 7.1. Heat map regarding the origin and distribution of *S. aureus*-positive food samples

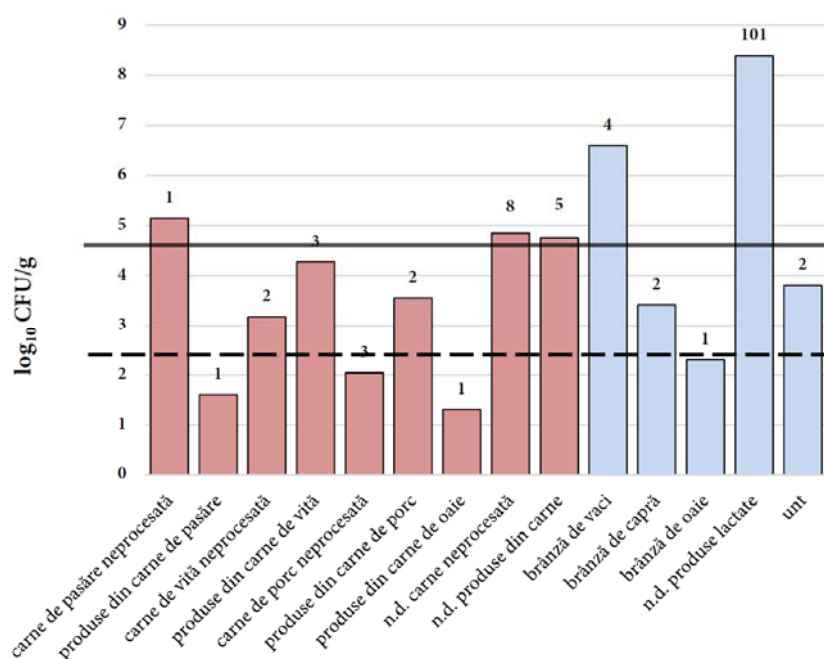


Figura 7.3. Numărul de UFC pentru *S. aureus* (\log_{10} UFC/g) per categorie, tip și origine alimentară. Numărul de probe analizate pe tipuri de produse alimentare este afișat deasupra fiecărei coloane. Liniile care trec prin coloanele (--) și (—) reprezintă valoarea maximă (M) stabilită pentru criteriile microbiologice în ceea ce privește laptele crud destinat prelucrării și în laptele praf și valoarea M pentru brânzeturile din lapte crud în conformitate cu EC 2073/2005. ICMSF recomandă 10^3 UFC/g

pentru produsele din carne și carne de pasăre procesată (ICMSF, 2011)

Profilul rezistenței la antibiotice al izolatelor MRSA

Testarea susceptibilității la antibiotice a raportat 14 profiluri de rezistență (Tabelul 7.1). Din toate tulpinile de MRSA studiate, 16 au fost multirezistente. Mai mult, izolatele MRSA au fost sensibile la toate antibioticele non-lactamice testate.

Tabelul 7.1. Profile de rezistență la antibiotice ale tulpinilor de MRSA izolate din alimentele confiscate de la călătorii din zboruri non-UE sau din frontieră la sol, 2012-2015

Profil de rezistență	Antibiotice ^a	Nr. tulpini	Procent (%)
RP0	β -lactams	6	22.2
RP1	PEN, TET, ERY	5	18.5
RP2	PEN, ERY	3	11.1
RP3	PEN, FUS, TET, TOB, GEN	2	7.4
RP4	PEN, TET, TOB	2	7.4
RP5	PEN, TET, SXT	1	3.7
RP6	PEN, TET, FUS	1	3.7
RP7	PEN, FOF	1	3.7
RP8	PEN, LVX	1	3.7
RP9	PEN, LVX, SXT	1	3.7
RP10	PEN, LVX, FOF, RIF	1	3.7
RP11	PEN, TET, ERY, CLI	1	3.7
RP12	PEN, TET, ERY, [OXA] ^b	1	3.7
RP13	PEN, TET, CIP, LVX, ERY, CLI	1	3.7

Notă: PEN, penicilină; FOF, fosfomicină; TET, tetraciclină; SXT, trimetoprim sulfametoxazol; FUS, acid fusidic; ERY, eritromicină; LVX, levofloxacină; TOB, tobramicină; RIF, rifampin; GEN, gentamicină; CLI, clindamicină; CIP, ciprofloxacina; MUP, mupirocin.

^aValorile MIC sunt cele indicate în ghidul EUCAST (2015);

^bParentezele indică susceptibilitate.

A fost determinat profilul enterotoxigenic al izolatelor MRSA. Majoritatea izolatelor au fost pozitive pentru genele care codifică enterotoxine cum sunt A, B, C, D, G, H, I, J. Niciun izolat testat nu a fost pozitiv pentru enterotoxina E. În general, 73% (19 din 26 tulpini de MRSA) codificau una sau mai multe gene *se* (Tabelul 7.2).

Patru tulpini (15,4%) codificau doar o singură genă *se*, iar restul de 15 (57,6%) codificau mai mult de o genă de tip *se*. Cele mai multe dintre ele sintetizau gene *seg/sei*, contabilizând 6 tulpini din totalul de gene pozitive. Interesant, izolatele MRSA testate pozitiv pentru genele *luk-PVL* nu au fost enterotoxigene.

Tabelul 7.2. Profilul enterotoxigenic al tulpinilor MRSA

Tipul de genă <i>se</i>	Număr (%) de tulpini MRSA	
	Lapte și produse lactate	Carne și produse din carne
<i>se</i> - negativ	5 (19.2)	2 (7.7)
<i>se</i> - pozitiv	16 (61.6)	3 (11.5)
<i>sea</i>	1 (3.85)	-
<i>seg</i>	1 (3.85)	-
<i>seh</i>	2 (7.7)	-
<i>sea/seb</i>	3 (11.5)	1 (3.8)
<i>sea/seh</i>	1 (3.85)	-
<i>seg/sei</i>	4 (15.4)	2 (7.7)
<i>sec/seg/sei</i>	1 (3.85)	-
<i>sed/seg/sej</i>	1 (3.85)	-
<i>sed/seg/sei/sej</i>	2 (7.7)	-

Caracterizarea genetică a izolatelor MRSA

Toate izolatele MRSA au fost pozitive pentru gena *mecA* prin Multiplex PCR și niciun izolat nu a încorporat omologul *mecC*. Caracterizarea suplimentară a izolatelor MRSA în ceea ce privește SCC*mec* a evidențiat că 37 de izolate (75,5%) aparțin SCC*mec* tip IV, în timp ce ultimele 12 izolate (24,5%) aparțin SCC*mec* tip V. Mai mult, pentru subtiparea SCC*mec* IV 48,9% aparțineau subtipului IVc și IVe, 22,4% pentru subtipul IVa și 4,1% pentru subtipul IVh. Interesant, tiparea SCC*mec* a trei izolate nu a fost posibilă: multiplex PCR-2, care clasifică clasa complexă *mecA*, amplifică fragmentul de ADN de 804 bp, aparținând tipului C, dar multiplex PCR-1 care furnizează complexul genei *ccr* nu îl amplifică. Aceeași situație s-a întâmplat și pentru un alt izolat, în timp ce multiplexul PCR-

1 a amplificat un fragment de ADN de 937 bp consecvent cu *ccr* de tip 2 (A2B2), iar multiplex PCR-2 nu l-a amplificat. Mai mult, șapte izolate au răspuns pozitiv pentru genele *luk*-PVL (SCC*mec* IV- subtipurile IVc și IVe).

Pentru a obține informații suplimentare despre caracterizarea izolatelor MRSA din acest studiu au fost determinate modelele PFGE și tipurile ST ale tulpinilor selectate.

Caracterizarea genetică a izolatelor MRSA de către *Sma*I-PFGE a furnizat un model constând în fragmente de ADN 13-17 de 20-670 kbp, aproximativ (Figura 7.4). Două izolate nu au putut fi tipate de către *Sma*I-PFGE, sugerându-se faptul că ar putea aparține ST398, deoarece această linie prezintă o rezistență neobișnuită la digestia cu *Sma*I (Chung *et al.*, 2000).

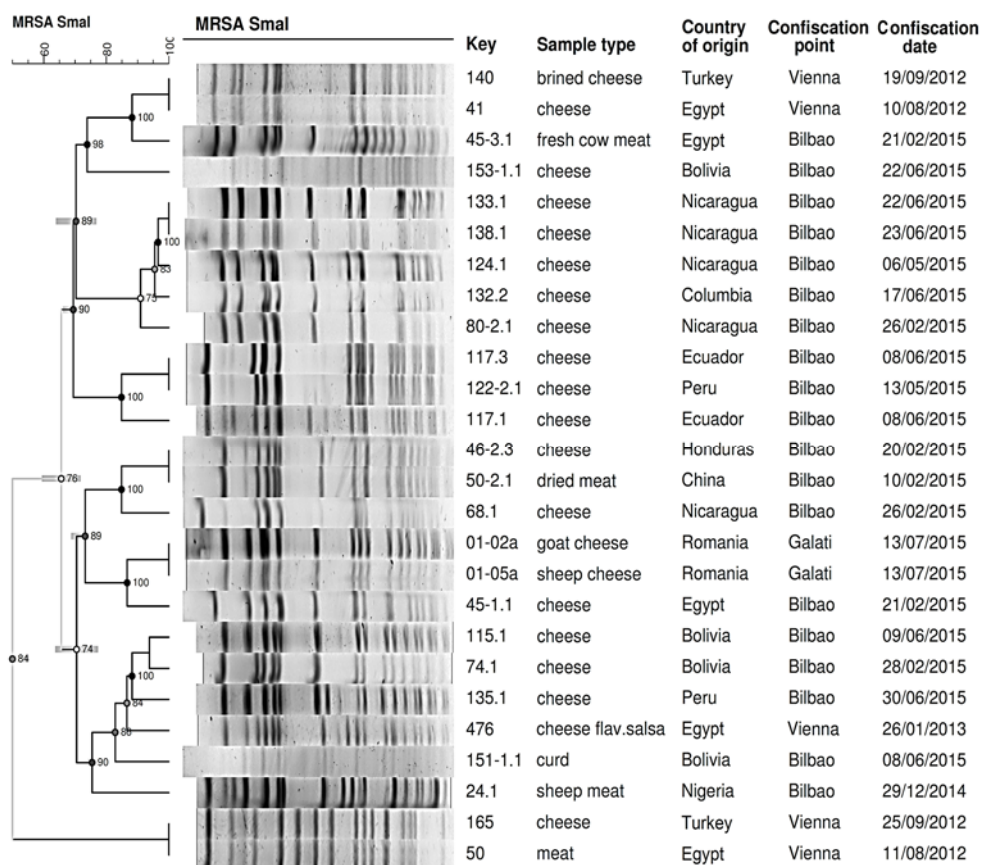


Figura 7.4. Relația genetică ce există între 26 de izolate de *S. aureus* metilino-rezistent (MRSA) obținută prin compararea profilurilor obținute ca urmare a electroforezei în gel în câmp pulsatoriu, folosind enzima de restricție *Sma*I. Izolatele MRSA au fost observate în rândul unui total de 136 de probe de alimente pozitive pentru *S. aureus*, confiscate de către autorități pasagerilor pe zborurile sau frontiera de la sol în apropierea țărilor UE, în perioada August 2012-Iulie 2015. Dendrograma a fost realizată prin utilizarea coeficientului de similaritate Dice cu metoda UPGMA cu 1% în valorile toleranței și optimizării. Scara indică valori de similitudine

Caracterizarea suplimentară a tulpinilor de MRSA cu ajutorul metodei MLST a evidențiat nouă ST. Cel mai frecvent profil alelic a fost reprezentat de ST5 (30,8%). Aceste tulpini au fost izolate din șapte probe de brânză, provenind de la pasageri din Nicaragua, Columbia, Egipt și Turcia, și un produs proaspăt din carne de vită de la un pasager care venea din Egipt. Mai mult decât atât, toate tulpinile au prezentat genotipuri conexe: trei tulpini au

prezentat același tipar, conținând SCCmec tip V, în timp ce ultimele cinci tulpini au fost de tip SCCmec tip IV.

Este interesant faptul că toate cele 8 probe de produse alimentare nu au fost confiscate la aceeași dată de prelevare, nici de pe același aeroport, astfel încât o eventuală contaminare încrucișată ce ar fi avut loc în timpul manipulării pachetului original nu este posibilă. Un alt aspect important îl reprezintă proba de brânză recuperată de la un pasager care venea din Turcia, din care a fost izolată o tulpină de *S. aureus* (OS-MRSA) sensibilă la oxacilină. Din cunoștințele noastre, aceasta este prima prezență a OS-MRSA în alimente de pe rutele de intrare ilegală în Europa.

Acest fapt atrage atenția asupra potențialului tulpinii OS-MRSA de circulație în Europa ca urmare a intrării ilegale a alimentelor prin zboruri internaționale. Toate celelalte tulpini MRSA au fost răspândite printre alte linii ST1649 (15,4%) și ST8 (15,4%), ultimul tip evidențiind 3 din 4 tulpini care conțin și gene PVL. În plus, ST1, ST22, ST72 și ST97 prezentate în MST (Figura 7.5) au fost predominante și în diferite produse de brânză tare și semi-tare. O altă clonă ST398 a fost găsită într-o probă de carne proaspătă confiscată de la un pasager care venea din Republica din Serbia spre Bilbao.

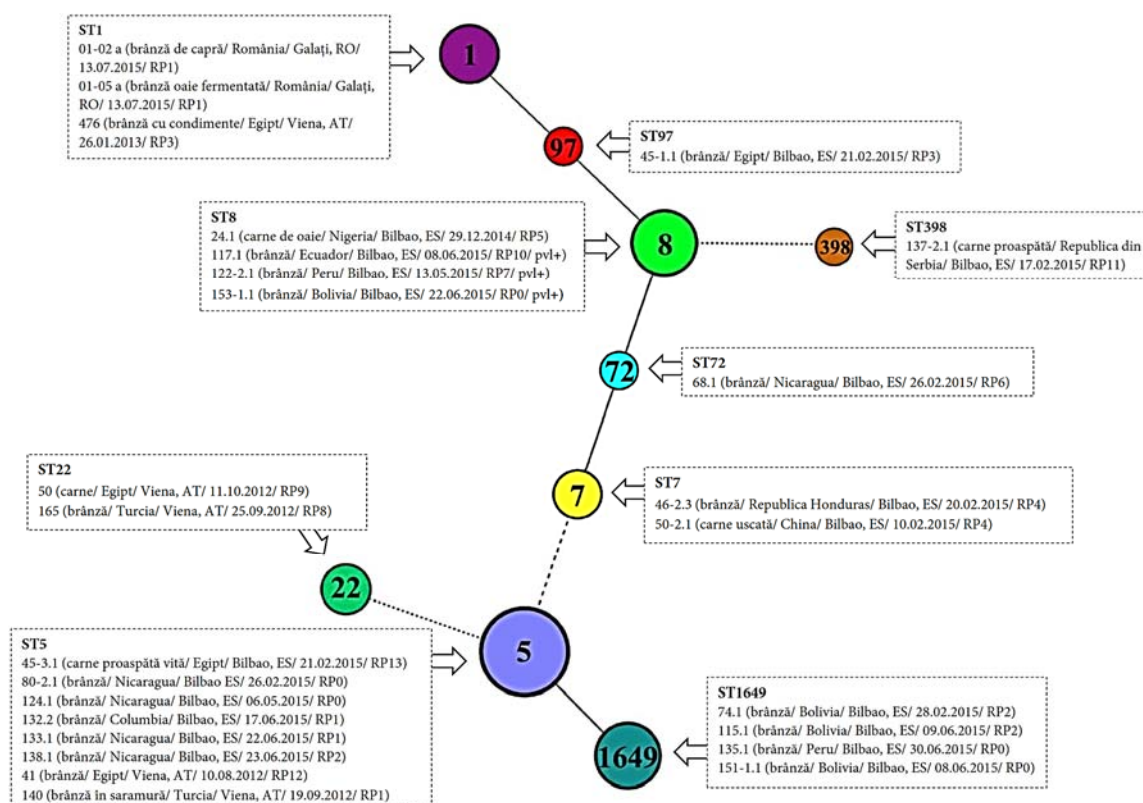


Figura 7.5. MLST a 26 de tulpini MRSA izolate din alimente introduse ilegal în UE. ST au fost grupate în funcție de cele șapte gene. Culori aleatorii au fost atribuite fiecărui ST. Tulpinile MRSA care aparțin aceluiași ST sunt reprezentate înconjurate de zone punctate. Informații referitoare la tipul probei/țara de origine/punctul de confiscare/data confiscării: ZZ.LL.AAAA/profilul de rezistență este dat în paranteze pentru fiecare tulpină MRSA, urmând codul tulpinii. Abrevieri utilizate: AT (Austria); ES (Spania); RO (România)

Discuții

Acest studiu evidențiază o problemă majoră cauzată de răspândirea MRSA ca urmare a intrării ilegale a alimentelor în Europa prin zboruri internaționale și piețe deschise aproape de frontierele terestre ale UE. Aproximativ 1/6 din totalul probelor (136 din 868 probe de probe confiscate, 15,7%) au fost confirmate ca fiind pozitive pentru prezența *S. aureus* din care 3% au fost reprezentate de tulpini MRSA pozitive care codificau gena *mecA*. Din toate izolatele, un număr mare dintre acestea s-a dovedit a fi multirezistente la trei sau mai mulți agenți antimicrobieni (Tabelul 7.1). Ambele fapte evidențiază rolul important al trecerii ilegale a alimentelor de origine animală în bagajele pasagerilor, deoarece tulpinile multirezistente ar putea fi distribuite în mod liber în întreaga lume prin zboruri, frontiere terestre sau alte mijloace de transmitere.

O altă problemă evidențiată în studiul nostru este cantitatea mare de probe contaminate cu *S. aureus* (Figura 7.2), în care *S. aureus* a depășit criteriile microbiologice impuse de legislația UE (Figura 7.3) (EC 2073/2005 amend. 2015), reprezentând o preocupare serioasă pentru sănătatea publică deoarece cantitatea ridicată a acesteia este suficientă pentru producerea enterotoxinelor preformate în produsele alimentare. Rezultatele obținute sunt asemănătoare cu alte date publicate, în care prevalența lui *S. aureus* are valori de 13% ajungând până la 60% (Crago *et al.*, 2012; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Ciolacu *et al.*, 2016) în produsele procesate, de origine animală.

Am raportat o prevalență de 64,6% *S. aureus* în probele de lapte și lactate confiscate pe aeroportul internațional din Bilbao, iar cea mai mare valoare (11,8%) a fost înregistrată pentru probele MRSA pozitive (Figura 7.2). Interesant este faptul că în studiul nostru au fost găsite mai mult de 3,17 log₁₀ peste limita stabilită în conformitate cu EC 2073/2005 pentru diferite tipuri de brânzeturi, cum ar fi brânzeturi moi, semi-tari sau tari.

Mai mult, 26 de tulpini au fost MRSA (3%), dintre care 19 au fost enterotoxigene. Practicarea de către populație a transportului ilegal de produse de origine alimentară, combinat cu sustragerea de la controlul de frontieră, poate conduce la apariția epidemiilor (Noordhuizen *et al.*, 2013).

În condiții necorespunzătoare de transport al alimentelor, ar putea apărea enterotoxine rezistente la tratament termic care să ducă la apariția toxiinfecțiilor alimentare. Multe dintre tulpinile de MRSA analizate au fost pozitive pentru una sau mai multe gene *se*, conform unui alt studiu publicat de Carfora *et al.* (2015), în care se confirmă prezența "tipurilor de enterotoxine clasice" în lapte și produse lactate. Mai mult, prezența lui *S. aureus* în diferite produse de origini animală a arătat că 19% dintre acestea au fost pozitive atât pentru genele care codifică enterotoxine cât și la oxacilină (Pereira *et al.*, 2009). Se pare că laptele și produsele lactate contaminate sunt de o importanță primordială pentru obținerea enterotoxinelor, însă legătura dintre sursa de contaminare a alimentelor și transferul determinantilor rezistenței la antibiotice rămâne neclară deoarece numai câteva rapoarte descriu prezența și posibila origine a MRSA în alimente (Ortega *et al.*, 2010).

Recent, UE a emis mai multe regulamente privind importul de animale și produse alimentare de origine animală. Cu toate acestea, aceste reglementări se referă adesea la aspectul comercial și la cantități mari de produse alimentare (EC 275/2007; EC 206/2009), lăsând cantități mici să treacă în timpul controlului la frontieră, mai ales dacă sunt destinate consumului personal.

Alimentele confiscate proveneau de la pasagerii cu o origine geografică foarte diversă: America de Sud și Centrală, Europa, Africa sau Asia (Figura 7.1), devenind o preocupare serioasă pentru sănătatea publică din cauza apariției episoadelor de toxiinfecții alimentare, mai mult din cauza faptului că aceste produse nu au suferit un tratament termic, conducând astfel la răspândirea tulpinilor multirezistente și enterotoxigenice, cum ar fi MRSA.

Secvențele predominante în acest studiu au fost reprezentate de ST5, ST8, ST1649, ST1 și alte secvențe distribuite local cum ar fi ST7, ST22, ST72, ST97 and ST398 (Figura 7.5). Cea mai răspândită secvență genetică a fost reprezentată de ST5 (30,8%), considerată a fi un salt, urmată de adaptarea tulpinii la noua gazdă (Lowder *et al.*, 2009). În ciuda faptului că ST5 a fost predominantă în cazul tulpinilor izolate din carnea de pasăre (Lowder *et al.*, 2009), în studiul nostru aceasta a fost implicată în cea mai mare parte în izolarea cu succes a tulpinilor din produsele lactate. Mai mult decât atât, ST5 a fost considerată o componentă majoră a MRSA și a MSSA asociate spitalelor și comunităților din întreaga lume (Miko *et al.*, 2013).

Alte tulpini de MRSA identificate în studiul nostru au fost asociate cu ST8-MRSA-IV/V și ST1649-MRSA-IV, care aparțin unor clone de succes ale CA-MRSA. Un caz de toxiinfecție alimentară comunitară provocată de MRSA producătoare de SEC (Jones *et al.*, 2002) a avut loc deja în SUA și producerea de enterotoxine stafilococice SEB, SEC, SED și SEE în două tulpini MRSA izolate din lapte, din fermele din Minnesota (Haran *et al.*, 2012).

Prezența genelor PVL și a diferitelor modele de susceptibilitate antimicrobiană legate de ST8-MRSA poate provoca îngrijorări, deoarece nu este clar dacă modul de manipulare de către muncitori ar putea juca vreun rol în procesul preliminar de sacrificare. În mod surprinzător, deși numeroase studii europene au raportat prezența ST398 cu o prevalență ridicată în alimente, în studiul nostru izolarea acestei clone a fost limitată doar la un produs lactat confiscat dintr-un bagaj provenit de la un pasager ce venea din Egipt. De remarcat este faptul că, în Olanda, această clonă a apărut rapid și acum reprezintă 20% din cazurile de MRSA din spitale și 42% din MRSA nou detectate, ceea ce indică faptul că animalele sunt importante rezervoare pentru infecția cu MRSA (Kadariya *et al.*, 2014).

Mai mult, deja au apărut epidemii cauzate de LA-MRSA ST398 (Wulf *et al.*, 2008b; Verkade *et al.*, 2012). Cu toate acestea, în studiile noastre, tulpinile care conțin genele *luk*-PVL și respectiv cele asociate cu LA-MRSA, nu au fost enterotoxigenice. Se pare că s-au găsit niveluri scăzute de izolate ST398 care transportă SE (Argudín *et al.*, 2011), în ciuda faptului că această linie este răspândită pe scară largă în țările europene (Oniciuc *et al.*, 2017).

Mai puțin frecventă este izolarea unei tulpini OS-MRSA dintr-un produs alimentar. Cu toate acestea, noi am izolat tulpina dintr-o probă de brânză transportată ilegal de un pasager din Turcia către Viena. Un astfel de fenotip este considerat ca fiind de o importanță primordială deoarece poate identifica în mod incorect prezența OS-MRSA (Ariza-Miguel *et al.*, 2015), rezultând în dezvoltarea MRSA cu rezistență ridicată la antibiotice β -lactamice.

În plus, această tulpină ar putea sintetiza trei tipuri de SE cum ar fi D, G, J și ar putea fi reprezenta o dovadă pentru demonstrarea unei posibile rute de intrare ilegală a alimentelor în Europa.

În concluzie, acest studiu demonstrează prezența HA-, CA- și LA-MRSA enterotoxigenice identificate în produsele alimentare confiscate de la pasageri din țări din afara UE, pentru care rolul lor potențial patogen, ca agenți patogeni alimentari, nu ar trebui neglijat. Acest studiu subliniază faptul că produsele alimentare introduse ilegal prin intermediul călătorilor reprezintă o cale importantă și alarmantă pentru transmiterea și răspândirea tulpinilor MRSA enterotoxigene. Trebuie luate măsuri eficiente de control pentru evitarea transmiterii la om a tulpinilor rezistente la antibiotice, prin consumul unor astfel de alimente. În același timp, călătorii trebuie să înțeleagă și să învețe să accepte interdicția privind traficul alimentar, în consecință existând riscul răspândirii agenților patogeni alimentari. Din nefericire, creșterea numărului de persoane care călătoresc și creșterea comerțului mondial vor contribui la epidemii viitoare, indiferent de măsurile care vor fi luate.

CAPITOL 8

Formarea biofilmelor de către izolatele MRSA recuperate din surse alimentare, provenite din bagajele călătorilor din afara UE

Din perspectiva siguranței alimentare, pot fi obținute diferite linii MRSA cu răspunsuri diferite în formarea biofilmelor prin manipularea și/sau consumul alimentelor. Acest studiu își propune să evalueze capacitatea de formare a biofilmelor de MRSA izolate din produsele alimentare. A fost adoptată o abordare *in vitro* adecvată. A fost pusă în evidență o corelație între formarea și compoziția biofilmului și aspectele moleculare ale izolatelor MRSA.

Rezultate

Capacitatea de formare a biofilmelor de către izolatele MRSA

Izolatele au fost clasificate pe baza capacității lor de a produce biofilme (Figura 8.1). Limitele de separare bazate pe valorile OD împart tulpinile MRSA în funcție de capacitatea acestora de a produce biofilme în tulpini slab producătoare ($OD_{NC} \leq OD < OD_C$), moderat producătoare ($OD_{NC} < OD \leq 3$) și puternic producătoare de biofilme ($OD > 3$). Valorile OD

pentru biofilme slabe (OD_{570} 1,03, SD 0,03), moderate (OD_{570} , 1,03–3) și puternice (OD_{570} 3,82, SD 0,12) au fost definite pe baza mediei OD_C obținute (OD_{570} , 3,65, SD 0,07) după corectarea probei martor (OD_{570} 0,16, SD 0,03). Patruzeci și unu (83,7%) dintre cele 49 de izolate MRSA testate au indicat o formare moderată a biofilmului, în timp ce restul de 8 (16,3%) au fost producători puternici de biofilm. **Tabelul 8.1** descrie rezultatele sintetizate ale izolatelor MRSA din diferite surse alimentare bazate pe capacitatea lor de a produce biofilme.

Tabelul 8.1. Formarea biofilmului de către izolatele MRSA în plăci de microtitrare hidrofobe cu 96 de godeuri la 37°C, condiții statice

Sursa	Formare de biofilm		Formare de biofilm moderat		Formare de biofilm puternic	
	n	%	n	%	n	%
Lapte și produse lactate	42	85.7	37	75.5	5	10.2
Carne și produse din carne	7	14.3	4	8.17	3	6.13

Aspectele moleculare și modelul de formare a biofilmelor de MRSA au fost evidențiate (**Tabelul 8.2**), în timp ce, în ansamblu, o biomasă mai mare produsă de biofilmele care posedă SCC_{mec} tip IV a fost pusă în evidență. Cu toate acestea, izolatele MRSA analizate în acest studiu au conținut SCC_{mec} tipurile IV sau V, fiind în concordanță cu faptul că astfel de tulpini au o probabilitate mai ridicată de a produce biomase mai mari de biofilm comparativ cu cele care conțin SCC_{mec} tipurile I-III (*Vanhommerig et al., 2014*).

Tabelul 8.2. Aspectele moleculare ale MRSA și tipul de formare a biofilmelor după 24 de ore, condiții statice

Izolant	Tip probă	Țara de origine	SCC_{mec}	ST	Formare biofilm	
					Moderat	Puternic
50	carne	Egipt	IV	22	+	
151-1.1						
151-1.2	brânză	Bolivia	IV	1649	+	
151-1.3						
153-1.1*						
153-1.2*	brânză	Bolivia	IV	8	+	
153-1.3*						
137-2.1	carne	Republica din Serbia	V	398	+	
137-2.2	proaspătă					
140	brânză în saramură	Turcia	V	5	+	
132.2						
132.3	brânză	Columbia	IV	5	+	
165	brânză	Turcia	IV	22	+	
41	brânză	Egipt	V	5	+	

Elena-Alexandra Oniciuc					Teză de doctorat	
80-2.1						
80-2.2	brânză	Nicaragua	IV	5	+	
80-2.3						
138.1	brânză	Nicaragua	IV	5	+	
138.2						
476	brânză cu condimente	Egipt	V	1	+	
124.1	brânză	Nicaragua	IV	5	+	
68.1						
68.2	brânză	Nicaragua	V	72	+	
68.3						
133-1.1						
133-1.2	brânză	Nicaragua	IV	5	+	
133-1.3						
115-1.1						
115-1.2	brânză	Bolivia	IV	1649	+	
115-1.3						
01-05a	brânză oaie,	România	IV	1	+	
01-05b	fermentată					
01-02a	brânză de capră	România	IV	1	+	
135.1						
135.2	brânză	Peru	IV	1649	+	
135.3						
45-3.1	carne proaspătă vită	Egipt	V	5	+	
117.1*						
117.2*	brânză	Ecuador	IV	8		+
117.3*						
122-2.1*	brânză	Peru	IV	8	+	
45-1.1	brânză	Egipt	V	97	+	
50-2.1	carne uscată	China	IV	7		+
74.1						
74.2	brânză	Bolivia	IV	1649		+
74.3						
24.1	carne de oaie	Nigeria	V	8		+
24.2						
46-2.3	brânză	Republica Honduras	IV	7		+

Notă: *-prezența genei *pvl*

O perioadă de termostatare prelungită (48 ore) a fost aplicată pentru cele opt izolate MRSA cu un OD₅₇₀ mai mare de 3, ceea ce demonstrează o acumulare mai mare a biomasei de

biofilm în timpul perioadei analizate (Figura 8.2). Pe baza acestor constatări, caracterizăm în continuare izolatele MRSA după 48 de ore de termostatare.

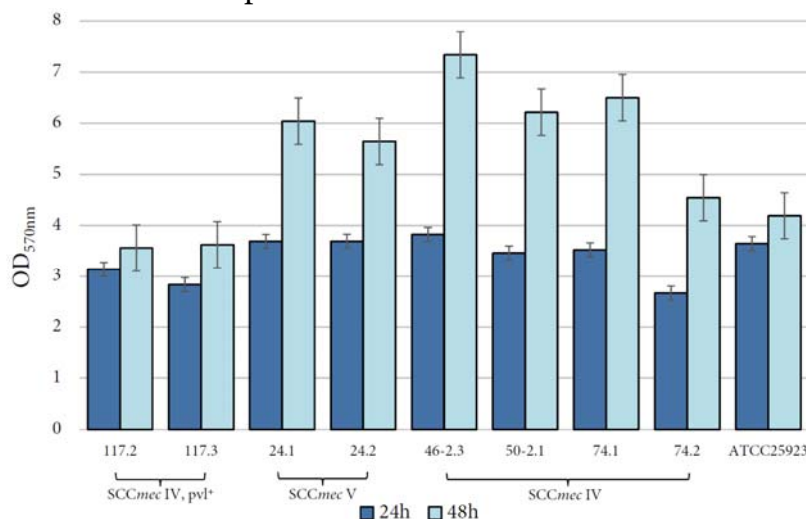


Figura 8.2. Cuantificarea biomasei biofilmelor MRSA după 24- și 48 ore folosind TSBG. Barele indică media valorilor OD \pm deviația standard (SD) de la trei experimente independente.

Valoarea controlului negativ a fost extrasă din valorile indicate

Similar cu măsurătorile OD, diferențe semnificative au fost observate în ceea ce privește cuantificarea celulelor viabile și calculele pentru substanța uscată a izolatelor MRSA producătoare de biofilme după 48 de ore (Figura 8.3).

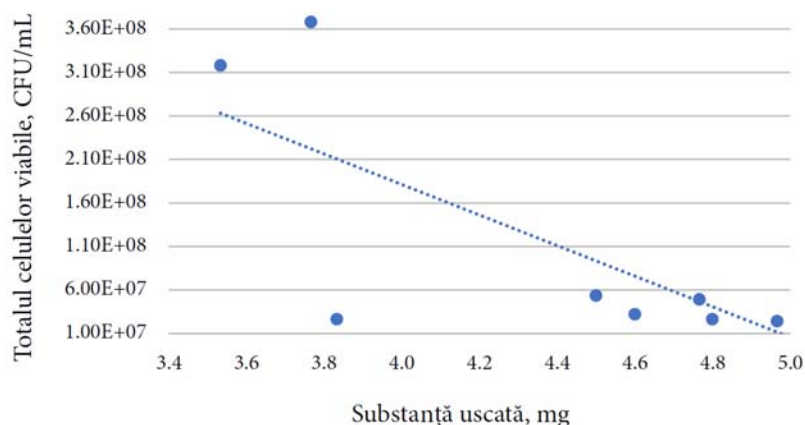


Figura 8.3. Biomasa și cuantificarea celulelor viabile din biofilmele MRSA după 48 ore. Valorile indică media aritmetică \pm deviația standard de la 3 experimente independente

După cum se poate observa, numărul de celule viabile din biofilmul MRSA scade odată cu creșterea biomasei. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că activitatea metabolică diferă deoarece biofilmele MRSA concurează pentru nutrienți disponibili într-un spațiu delimitat. Celulele viabile rămase pot prezenta diferite stări metabolice dependente de biomasa totală a biofilmului acumulată în 48 de ore. Deși *Staphylococcus* spp. este cunoscut a forma biofilme puternice (Bridier *et al.*, 2010), acest lucru nu este cazul modului de formare a biofilmelor izolatelor 117.2 și 117.3, în care viabilitatea celulară a fost extrem de mare, explicată prin lipsa aderenței celulelor la suprafețele polistirenilui.

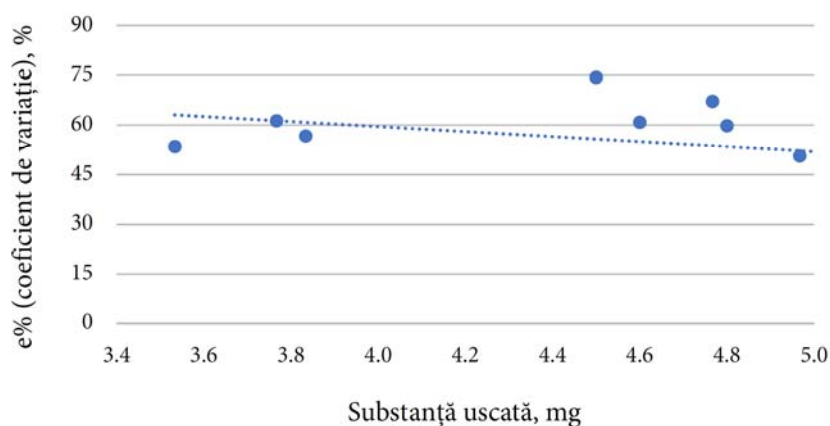


Figura 8.4. Coeficientul de variație funcție de biomasa biofilmelor formate de izolatele MRSA

În **Figura 8.4** este reprezentat coeficientul de variație calculat pentru diferite biomase aparținând biofilmelor MRSA după 48 ore. Nu a fost observată o eroare de mai mare de 15% între diferitele biomase reprezentate în acest grafic.

Analiza CLSM a izolatelor MRSA

Reprezentarea structurii biofilmelor MRSA după 48 ore cu ajutorul CLSM în conjugare cu diferiți coloranți fluorescenți este prezentată în **Figura 8.5**. Imaginile CLSM diferențiază celulele bacteriene (verde) de proteine (roșu) și PNAG (albastru) în matricea biofilmelor.

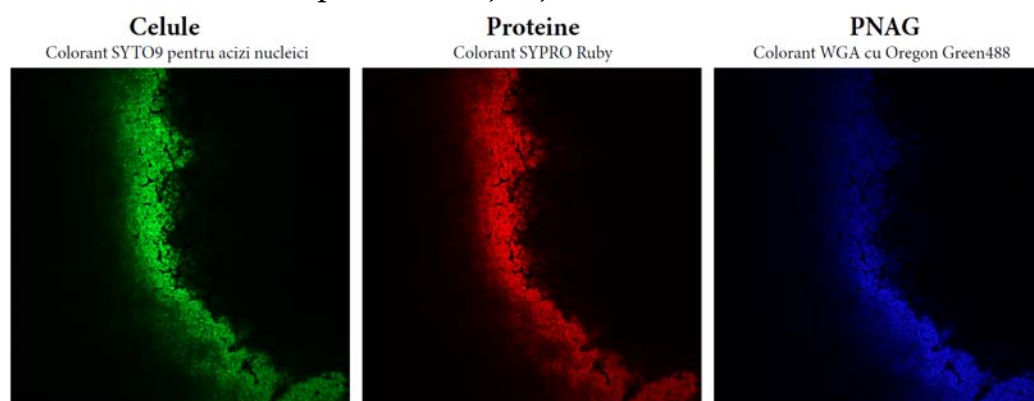


Figura 8.5. Vizualizarea biofilmului obținut din observațiile confocale ale izolatului MRSA 117.2, diferențiind componentele acestuia (celule- stânga, centru- proteine, polizaharide- dreapta). Un singur z-stack este reprezentat

Biofilmele MRSA au format structuri plate și compacte, în timp ce unele dintre ele au dezvoltat structuri ușor tridimensionale acoperite de zone de agregate celulare fluorescente în interior. De exemplu, izolatul MRSA 117.2 a avut o acumulare de biomasă de $0,06481 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ reprezentată de proteine; $0,0792 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pentru PNAG, în timp ce celulele au acoperit doar $0,05938 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (**Figura 8.6**). Producția de biofilm formată de tulpina *S. aureus* ATCC 25923 utilizată în acest studiu ca referință este compusă în principal din PNAG, date confirmate și de alte studii (Skogman *et al.*, 2012; Oniciuc *et al.*, 2016).

În ceea ce privește izolatul MRSA 24.1, o acumulare de biomasă de $0,15277 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ acoperită de proteine; $0,08279 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ reziduuri de poli-*N*-acetilglucozamină și $0,10528 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ de celule viabile a avut loc. Se pare că, în acest caz particular, conținutul de

proteine este responsabil de structura acestui biofilm. Cu toate acestea, matricele biofilmelor MRSA analizate au avut cantități similare de polizaharide, proteine și ADN în matricea acestora.

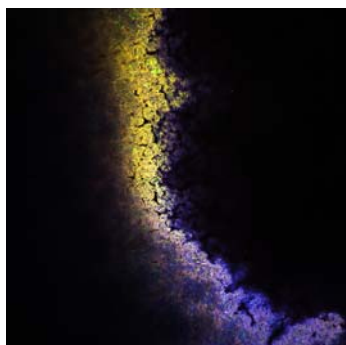


Figura 8.6. Imaginea biofilmului obținut din observațiile confocale ale izolatului MRSA 117.2 colorat cu toate cele trei tipuri de coloranți, utilizând un obiectiv cu imersie în ulei

Discuții

Capacitatea bacteriilor de a forma biofilme este de o importanță deosebită și reprezintă o mare provocare pentru industria alimentară, deoarece unele tulpini, în starea lor normală, planctonică, pot tolera agenți antimicrobieni, făcând bacteria extrem de dificil de eradicat (Basanisi *et al.*, 2017). Apariția *S. aureus* rezistentă la agenți antimicrobieni, cum ar fi rezistența la metilino, a provocat o mare îngrijorare din cauza prezenței sale în alimentele asociate (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015).

În studiul de față, au fost testate 49 de izolate MRSA, izolate din surse alimentare, în ceea ce privește capacitatea lor de formare a biofilmelor, utilizând mediul TSBG, termostatare la 37°C, temperatura propice pentru apariția bolilor infecțioase (EC 853/2004). TSB plus glucoză sau NaCl s-au dovedit a îmbunătăți formarea biofilmelor pe plăci de microtitrare (godeuri) așa cum unii cercetători au sugerat în încercarea acestora de a găsi cele mai bune medii de cultură, în care *S. aureus* poate forma biofilme reproductibile și robuste (Luong *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012).

Pe baza rezultatelor obținute, s-a observat o variație a capacității de a forma biofilme bazate pe măsurători OD. Datele noastre au arătat că majoritatea izolatelor MRSA au capacitatea de a acumula biofilme moderate (83,7%), dar există și formatori puternici de biofilm (16,3%). Hidrofobicitatea pare a fi un factor important care contribuie la capacitatea de formare a biofilmelor de către izolatele MRSA. Rezultate prezentate în acest studiu sunt similare cu studiile anterioare (Pagedar *et al.*, 2010).

Evaluarea biofilmelor MRSA după 48 ore a fost realizată prin determinarea numărului de celule viabile prezente în cantitatea totală a biomasei biofilmului. Pe baza măsurătorilor DW, izolatul MRSA 74.1 a avut o biomasă semnificativ mai mare decât ATCC 25923, dar aceste diferențe nu au fost corelate cu numărarea CFU după 48 de ore de creștere. Acestea pot fi explicate prin faptul că aceste biofilme au fost compuse din celule și substanțe polimerice extracelulare, ceea ce sugerează că 74.1 a acumulat o matrice biofilmică mai densă, restul celulelor concurând pentru supraviețuirea lor. Cu toate acestea, biofilmele

dezvoltate după 48 de ore se așteaptă a avea clustere stabile de celule care pot interfera cu numărarea coloniilor din plăci (Freitas *et al.*, 2014).

Mai târziu, CLSM ne-a permis efectuarea unei analize vizuale a distribuției polizaharidelor, a acizilor nucleici și a componentelor proteice din biofilmele analizate. A fost observată o distribuție similară în densitatea celulară, precum și în ceea ce privește matricea exopolimerică produsă. Cu toate acestea, în alte studii, s-a observat mai mult conținut de proteine decât PNAG în matricele de biofilm legate de sursele alimentare (Ferreira *et al.*, 2012; Oniciuc *et al.*, 2016).

În acest studiu, s-au observat diferite modele de biofilm asociate cu linii clonale ale MRSA, în special pentru acele MRSA care conțin SCCmec de tip IV și V, aceste date fiind în concordanță cu alte studii. De exemplu, Mirani *et al.* (2013) a constatat că 98,3% din izolatele MRSA au conținut SCCmec de tip IV, fiind legate ulterior cu capacitatea lor de biofilm. Mai mult decât atât, diferite modele de biofilm asociate cu linii clonale ale MRSA sunt prezentate într-un studiu realizat de Vanhommerig *et al.* (2014), sugerând că MRSA care conține SCCmec de tip IV produce o cantitate semnificativ mai mare de biomasă în condiții statice decât SCCmec de tip I-III. Însă, atunci când se utilizează condițiile dinamice, se observă o acumulare mai mare de biomasă pentru cele care corespund SCCmec de tip I-III decât SCCmec de tip IV (Vanhommerig *et al.*, 2014). Totuși, Parisi *et al.* (2016) a observat o asociere între SCCmec de tip IV sau V și formarea de biofilme, în timp ce prevalența ridicată a unor astfel de cazete stafilococice promovează capacitatea de producere a biofilmelor formate de *S. aureus*, permițând astfel bacteriilor să persiste în mediul înconjurător.

Concluzii

Deoarece numeroase studii au confirmat rolul potențial al alimentelor în diseminarea cu succes a liniilor de MRSA, este important, de asemenea, să se țină seama de capacitatea lor de a forma biofilme. În zilele noastre, există o preocupare din ce în ce mai mare cu privire la posibilele rute de circulație a tulpinilor de MRSA în bagajele călătorilor în spațiul UE, deoarece aceste tulpini pot forma biofilme, care pot acționa ca strategie de supraviețuire împotriva anumitor condiții de mediu.

Rezultatele obținute până acum ne-au oferit noi asigurări că tulpinile MRSA izolate din alimentele de origine animală sunt capabile să formeze biofilme. Prin cunoașterea componentelor principale ale matricei din cadrul biofilmelor, putem contracara mecanismele implicate în rezistența biofilmului prin aplicarea unor strategii de control adecvate cu un accent deosebit, în prezent, pe cele alternative cum ar fi enzimele de degradare a biofilmului, utilizarea inhibitorilor sau utilizarea bacteriofagilor. Astfel, ar trebui să se facă eforturi de combinare a soluțiilor convenționale care vizează diferiți constituenți ai biofilmului. În plus, este necesară supravegherea și controlul de rutină în ceea ce privește alimentele introduse în UE, deoarece agenții patogeni alimentari pot fi distribuiți în mod liber și pot promova formarea biofilmelor.

CAPITOL 9

Studiu de caz- *Staphylococcus aureus mecA*-pozitiv sensibil la oxacilină asociat cu un aliment procesat în Europa

Unele studii au raportat tulpini *S. aureus* sensibile la cefoxitină sau metilino (MSSA) clasificate prin teste de laborator convenționale, dar care genotipic posedă gena *mecA*. Aceste tulpini au fost definite ca fiind *mecA*-pozitive susceptibile la oxacilină (OS-MRSA), fiind de asemenea cunoscute ca tulpini MRSA sensibile la cefoxitină. Datorită interpretării greșite a studiilor fenotipice cu referire la oxacilină sau cefoxitină, astfel de tulpini pot fi greșit diagnosticate, declanșând dezvoltarea de noi variante de MRSA rezistente sub selecția de antibiotice din cauza posesiei *mecA*.

OS-MRSA a fost raportat în izolatele clinice (Hososaka *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012; Conceição *et al.*, 2015), la animale (Pu *et al.*, 2014) și recent în alimente de origine animală cum ar fi carnea (Raji *et al.*, 2016), care reprezintă o provocare serioasă pentru testele de diagnostic convenționale de rutină (Malhotra-Kumar *et al.*, 2010; Ariza-Miguel *et al.*, 2015) și pentru eventualele tratamente asociate cu infecții datorate fenotipului sensibil de oxacilină al acestor tulpini.

Tulpinile OS-MRSA par a fi diverse din punct de vedere genetic, sistemele de reglare *mec* și *bla* fiind de primă importanță în reglarea expresiei fenotipice a rezistenței la metilino (Sabat *et al.*, 2015). Acest studiu a urmărit examinarea genomului complet al unei tulpini *S. aureus mecA* sensibilă la oxacilină, izolată dintr-un produs alimentar procesat care conține SCC*mec* de tip V și aparține secvenței MLST tip 5.

Rezultate și discuții

Caracteristici fenotipice

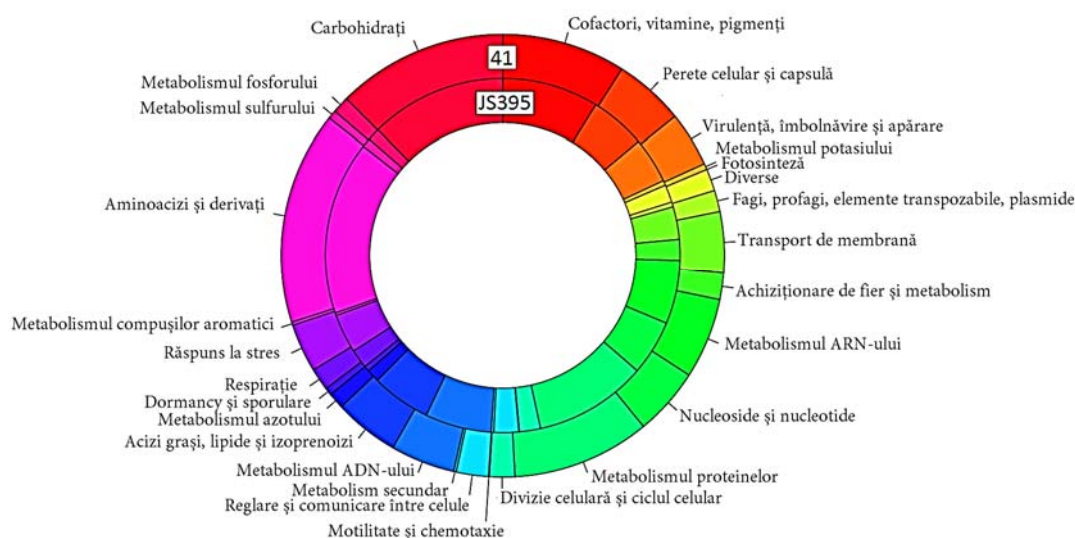
Concentrația minimă inhibitorie (MIC) pentru oxacilină pentru tulpina OS-MRSA 41 a fost detectată în intervalul de susceptibilitate de către sistemele automate Microscan (Beckman Coulter SLU) și Vitek II (BioMérieux, Franța), și confirmată și prin utilizarea plăcilor de microtitrare Gram Positive All-in-One (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland). Screening-ul suplimentar pentru interpretarea diametrului zonei de inhibiție a arătat că tulpina studiată a fost sensibilă la cefoxitină (30 μg/disc, Oxoid) prin metoda difuziei discului. Mai mult, tiparul de susceptibilitate la antibiotice a demonstrat că tulpina este pozitivă privind rezistența la clindamicină și tetraciclină, rezistentă la penicilină și prezintă rezistență intermediară la eritromicină. Caracteristicile izolatului OS-MRSA sunt detaliate în tabelul următor (Tabelul 18).

Tabelul 9.1. Caracteristici fenotipice și genotipice ale tulpinii OS-MRSA 41

Test	OS-MRSA 41
Screening fenotipic	
Producere de coagulază	pozitiv
MIC oxacilină (μg/mL)	0.5
MIC tetraciclină (μg/mL)	>8
MIC eritromicină (μg/mL)	>4
MIC penicilină (μg/mL)	>0.25
Screening cefoxitină	
-Disk diffusion (mm)	sensibil (24.5)
-Brilliance MRSA 2 Agar	sensibil
Screening genotipic	
<i>mecA</i>	pozitiv
SCC <i>mec</i>	V
<i>lukS</i> -PV & <i>lukF</i>	negativ
Secvență tip	ST5

Caracteristici genotipice

Secvența genomului OS-MRSA 41 a fost comparată cu secvența tulpinii *S. aureus mecA*-pozitiv care conține SCC*mec* V, izolată de la un pacient din Elveția în 2008, denumit JS395 (CC395-V) (Larsen *et al.*, 2017). MLST și tipizarea SPA au fost realizate utilizând mlst v2.6. (T. Seemann; <https://github.com/tseemann/mlst>) și respectiv spaTyper v1.0 (Bartels *et al.*, 2014), arătând faptul că tulpina OS-MRSA 41 are un *spa*-type t688 frecvent asociat cu MRSA ST5/SCC*mec* V (Basanisi *et al.*, 2017). Genomul complet al tulpinii OS-MRSA 41 a constat dintr-un cromozom a cărui mărime e de 2.819.217 bp, în timp ce genomul complet JS395 a fost compus din 2,846,866 bp (GenBank/DDDBJ/ENA, număr de acces CP012756). Contigurile au fost adnotate folosind platforma RAST determinând numărul de subsisteme determinate automat și prezente în ambele genoame luate în analiză. Estimările detaliate privind diferitele subsisteme prezente în ambele genoame sunt ilustrate în Figura 9.1.

**Figura 9.1.** Comparare între diferitele subsisteme prezente în genoamele OS-MRSA 41 și JS295

După cum se poate observa, conținutul de gene care aparține fiecărui subsistem prezent în ambele genoame este puțin diferit. Distribuția genelor legate de fagi, profagi, elemente transpozabile sau plasmide prezente în OS-MRSA 41 pare a fi mai mare în comparație cu cea a subsistemului din JS395. Treizeci și doi de fagi și elemente transpozabile, reprezentate de 1,57% din conținutul total al genomului, au fost prezente în OS-MRSA 41. Cu toate acestea, un număr redus a fost prezent în JS395, reprezentând doar 0,44% (nr. 9) din total.

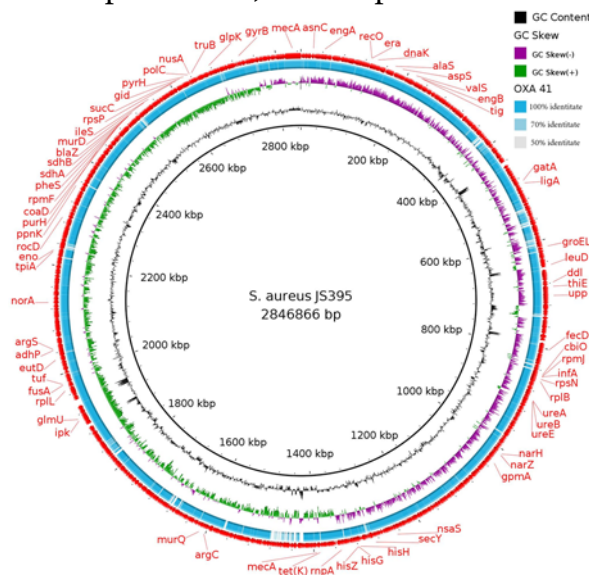


Figura 9.2. Cromozomul tulpinii OS-MRSA 41

Genomul OS-MRSA 41 este compus din 2.819.217 bp, cu un conținut GC de 32,8% (Figura 9.2). Caracteristicile unice ale acestui genom au fost comparate cu genomul tulpinii *S. aureus* JS395 (cercul interior negru). Genomul tulpinii OS-MRSA 41 este reprezentat de cercul interior albastru. Cercul exterior roșu arată secvențele de codare (genele presupuse), respectiv, pe lungimile plus și minus. Ambele tulpini au SCCmec de tip V, în timp ce analizele detaliate au arătat că structura regiunii de legare J1 și a genelor *mecA* și *ccrC* este aproape identică, dar diferă între ele în regiunea de legare J3 (Figura 9.3). În elementul SCCmec al tulpinii OS-MRSA 41, o gena de rezistență la tetraciclină, *tet(K)*, cauzată de integrarea IS431, se găsește în regiunea de legare J2. De remarcă, CRISPRFinder (Grissa et al., 2007) a identificat 11 CRISPR-eri în întregul genom al tulpinii studiate, în timp ce un CRISPR locus cu dimensiunea de 10.687 bp a fost găsit în regiunea de legare J1.

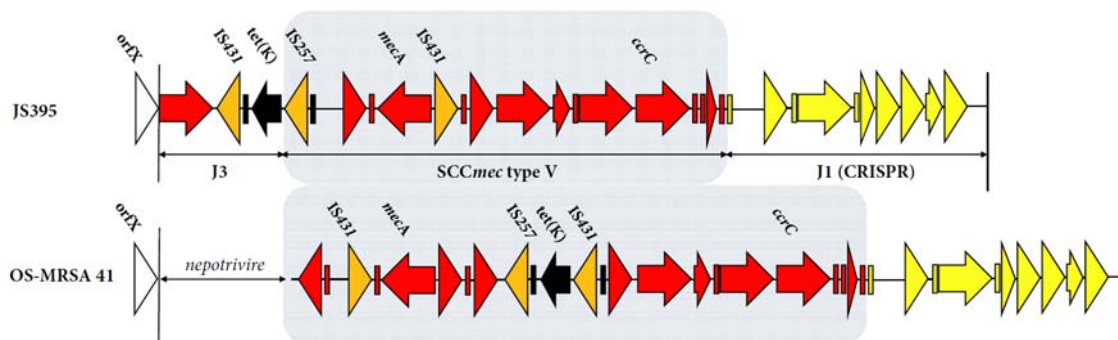


Figura 9.3. Analiza comparativă a structurii elementului SCCmec în *S. aureus* JS395 (numărul de acces DDBJ/ENA/GenBank CP012756) și tulpina OS-MRSA 41

Analiza secvențelor genelor prezente

Analiza secvențelor genelor de rezistență antimicrobiană efectuată prin folosirea abricate v0.3 (T. Seemann; <https://github.com/tseemann/abricate>) a dezvăluit prezența genelor *blaZ*, *erm(C)*, *fexA*, *mecA*, *norA*, *tet(K)* și *tet(M)* (Tabel 9.2). În plus, s-au observat elemente genetice mobile cauzate de inserția secvențelor cum ar fi (IS)30, IS256, IS431, IS1181, IS1182(ISSau3), ISL3 (ISSau8); transpozon (Tn)3; tirozinaza recombinată *XerD*. Analiza genomului a arătat că genele de rezistență care ar fi trebuit să îi confere tulpinii, din punct de vedere fenotipic, o rezistență la β -lactami, macrolide, tetracicline și aminoglicozide.

Analiza secvenței complexului genei *mec*. SCC_{mec} de tip V posedă complexul de gene *mec* clasa C, iar elementele de reglare *mecI-mecR1* sunt absente sau truncate rezultate din inserția IS431. Secvența genei *mec* de 1904 bp a fost aproape identică cu cea a lui JS395, pentru care s-a găsit *mecA* cu o acoperire a genei 100%, dar cu 99,95% identitate genetică. Variabilitatea a relevat un SNP (A \rightarrow G) în poziția *mecA* 1770 care este tradus într-o variație de aminoacid în domeniul trans peptidazei (poziția 589) a proteinei MecA formate (S \rightarrow P).

Analiza secvenței sistemului *blaZ*. Gena *blaZ* și genele sale de reglare *blaI* și *blaR1* au fost prezente în tulpina OS-MRSA 41, cu o acoperire de 100%, dar 99,054% identitate, prezentând șapte SNP-uri. Chiar dacă tulpina OS-MRSA 41 a prezentat un nivel de rezistență la penicilină (MIC > 0,25 μ g/mL), mai multe SNP din secvența genei *blaZ* pot contribui la susceptibilitatea fenotipică la oxacilină a tulpinii *mecA* pozitivă studiată.

Analiza secvenței altor gene. BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) a fost realizată față de o bază de date genetice personalizate. Tabelul 9.2 descrie factorii de virulență asociați cu proteinele responsabile cu aderența, exotoxinele și exoenzimele exprimate în OS-MRSA 41. Multe exoenzime secretate găsite în OS-MRSA 41 au fost reprezentate de proteaze, lipaze (cum ar fi glicerol ester hidrolaza) și nucleaze, cu rolul lor specific în patogenează. OS-MRSA 41 produce câteva proteaze majore, incluzând o metaloproteinază (Aur, aureolizină), două proteaze cisteinice (SspB, stapopain B și SspC, staphostatina B) și o serin protează (SspA, stapopain A).

Funcția biologică a acestor proteaze poate fi privită ca inhibitori potențiali de completare (Jusko *et al.*, 2014), prin limitarea capacității gazdei de a lupta împotriva agenților patogeni bacterieni. De exemplu, proteazele de cisteină exprimate prin OS-MRSA 41 pot degrada elastina, colagenul și fibrinogenul (Ohbayashi *et al.*, 2011), cele mai importante afectând țesuturile, ducând la distrugere și ulceratii; în timp ce degradarea imunoglobulinelor umane poate fi produsă de serin proteaza V8 (Prokešová *et al.*, 1992). Alte studii au arătat implicațiile metaloproteinazei Aur în formarea unei serin proteaze mature (Rice *et al.*, 2001).

Mai mult decât atât, inactivarea peptidelor antimicrobiene poate fi evaluată prin activitatea metaloproteinazei Aur, care s-a dovedit a avea un mare impact asupra patogenezei osteomielitei (Cassat *et al.*, 2013). Alte exoproteine găsite în OS-MRSA 41 au fost reprezentate de stafilokinază și inhibitor de complement stafilococ (SCIN) implicat în

degradarea cheagurilor de fibrină datorită activării plasminogenului în plasmină (Jusko *et al.*, 2014). În cele din urmă, alte exoenzime care codifică factorii de virulență potențiali sunt reprezentați de lipaze și nucleaze care pot inactiva acizii grași și pot scădea activitatea antibacteriană a neutrofilelor (Otto, 2014).

Mai mult, virulența OS-MRSA 41 poate fi caracterizată prin secreția mai multor exotoxine, în care potențialul său de a provoca posibile boli este mai mare, deoarece poate interveni direct asupra gazdei (Otto, 2014). Variante de γ -hemolizină care codifică genele *hlgA*, *hlgB* și *hlgC* au fost găsite în OS-MRSA 41, cu rolul lor prezumtiv în deteriorarea membranei plasmatică a celulei gazdă (Vandenesch *et al.*, 2012).

Mai târziu, deși MRSA enterotoxigenic în alimente a fost găsit sporadic și tipic asociat cu produsele lactate (Haran *et al.*, 2012; Carfora *et al.*, 2015), OS-MRSA 41 codifică mai multe tipuri de enterotoxine, fapt confirmat de PCR la testarea enterotoxinelor clasice (tipurile A-E). Astfel de enterotoxine pot fi rezistente la majoritatea enzimelor proteolitice, prin menținerea activității lor în tractul digestiv după ingerare (Ortega *et al.*, 2010), din acest motiv prezența lor și posibila activare nu trebuie ignorate. Cu toate acestea, superantigenul de toxină pirogenică, cum ar fi toxina sindromului șocului toxic (TSST), exfoliatinele și leucocidinele, cum ar fi leucocidina Panton Valentine (PVL), nu au fost detectate. Faptul că PVL nu a fost detectat nu a fost surprinzător deoarece toate izolatele OS-MRSA testate din mediul înconjurător, au fost negative pentru acest factor de virulență, în schimb au fost detectate genele *lukED*, care codifică leucotoxina biocomponentă LukE și LukD (Gharsa *et al.*, 2012) cu activitatea leucotoxică scăzută.

În plus, componentele de adeziune ale peretelui celular (CWA) găsite în OS-MRSA 41 pot avea un rol în virulență (Gordon and Lowy, 2008), favorizând bacteriile să se adapteze la condițiile de mediu ostile, permițând supraviețuirea și promovarea infecției prin invadarea și distrugerea țesuturilor gazdei. Pentru ca toate acestea să se întâmple, este necesar să se exprime regulonul predominant *agr* în OS-MRSA 41. S-a demonstrat că sistemul *agr* este necesar pentru exprimarea enterotoxinelor stafilococice (Ortega *et al.*, 2010). Mai mult, la activare, sistemul *agr* poate regla sinteza toxinelor și enzimelor extracelulare (Ortega *et al.*, 2010); totuși, prezența genei *Bap* lipsește, astfel încât proliferarea și producerea matricei extracelulare (Speziale *et al.*, 2014) odată atașată la suprafețe ar putea lipsi.

Concluzii

În ultimul deceniu, au fost raportate numeroase studii privind detectarea izolatelor OS-MRSA din țări foarte distincte din punct de vedere geografic (Hososaka *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2014; Andrade-Figueiredo and Leal-Balbino, 2016; Sabat *et al.*, 2015) dar, după cunoștințele noastre, acesta este primul raport privind prezența unei tulpini *S. aureus mecA*-pozitivă sensibilă la oxacilină în alimentele procesate în Europa. Această descoperire, împreună cu rezultatele anterioare obținute în cadrul grupului nostru (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015; Oniciuc *et al.*, 2015) atrage atenția asupra unei rute de diseminare a tulpinilor de MRSA prin intrarea ilegală cu alimente în Europa.

Studii privind prezența izolatelor OS-MRSA în mediul clinic au apărut din ce în ce mai mult în ultimii ani, cu o distribuție geografică largă; de pe continentul asiatic, cu țări cum ar fi Taiwan, Japonia sau China, către cel european(UK) și african (Pournaras et al. 2013). Deși OS-MRSA a fost în principal circumscrisă mediului clinic, un studiu recent a demonstrat prezența izolatelor OS-MRSA la efectivele de animale asociate cu mastita bovină în patru regiuni diferite din China (Pu et al. 2014) și probe de carne de cămilă dintr-un magazin în Riyadh, Arabia Saudită (Raji et al. 2016). Deoarece există foarte puține informații despre modul acestora de a recâștiga capacitatea completă de reglare a genei (Sabat et al. 2015), astfel de izolate nu ar trebui neglijate deoarece pot acumula o rezistență neobișnuită sub selecția antibioticelor datorită genei *mecA* (Saeed et al. 2014) și, în schimb, ar trebui să fie considerate de importanță primordială.

Cu toate acestea, până la acest studiu, tulpini de OS-MRSA nu au fost raportate în produsele alimentare procesate. Interesant, tulpina OS-MRSA analizată în acest studiu a fost clasificată ca MRSA-ST5-V, care a fost identificată anterior și în izolatele OS-MRSA din mediul înconjurător (Pu et al., 2014; Raji et al., 2016). Tipurile de secvențe MRSA STs și *SCCmec* identificate în izolate din comunitățile non-clinice sunt diferite de cele recurente, izolate în medii clinice. Acest lucru ar putea sugera că o diseminare semnificativă din mediul medical în mediul înconjurător nu a apărut încă, deoarece tulpinile OS-MRSA din mediul înconjurător prezintă un profil genetic distinctiv. Până în prezent, izolările clinice de tulpini OS-MRSA din mediul medical au arătat tipuri variabile ST și *SCCmec*, indiferent de originea geografică din care au fost recuperate.

În concluzie, raportăm, pentru prima dată, prezența OS-MRSA în Europa într-un produs de origine animală, procesat. Deși această variantă de MRSA pare a fi rară, aceasta are o importanță deosebită pentru sănătatea publică din cauza potențialului său de a dezvolta tulpini de MRSA foarte rezistente sub tratament cu antibiotice β -lactamice și deoarece s-ar putea să nu fi fost detectate prin proceduri standard de testare. Demonstrarea faptului că noua variantă de MRSA, OS-MRSA, este deja prezentă în alimentele din Europa, subliniază necesitatea de a nu subestima alimentul ca fiind o rută a transmiterii MRSA, precum și necesitatea monitorizării prezenței și evoluției OS-MRSA în produsele alimentare și mediul înconjurător. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a identifica factorii și mecanismele genetice suplimentare în cazul acestor izolate.

CAPITOL 10

Evaluarea mediilor cromogene pentru confirmarea tulpinilor MRSA izolate din mediul clinic, animale și alimente de origine animală

Mai multe medii cromogene disponibile în comerț au fost dezvoltate pentru a facilita screening-ul MRSA, iar unele studii au evaluat performanțele lor de diagnosticare (Verkade *et al.*, 2011; Veenemans *et al.*, 2013; McElhinney *et al.*, 2013). Cu toate acestea, s-au concentrat în principal pe probe clinice și de aceea există un decalaj de cunoștințe privind tulpinile de MRSA din probele de animale și de alimente. Prin urmare, în acest studiu am evaluat performanțele a două medii cromogene, Brilliance MRSA 2 Agar (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SUA) și ChromID MRSA Agar (bioMérieux, Franța) (Figura 10.1) ca teste rapide de screening MRSA de confirmare a izolatelor *S. aureus* dintr-o gamă largă de probe, de diferite origini: probe clinice, animale și alimentare. Am evaluat, folosind testul McNemar pentru eșantioane pereche, dacă există diferențe semnificative, din punct de vedere statistic, între metoda de referință, detectarea moleculară a genelor de rezistență *mecA* și *mecC* și confirmarea MRSA prin utilizarea ambelor medii cromogene.

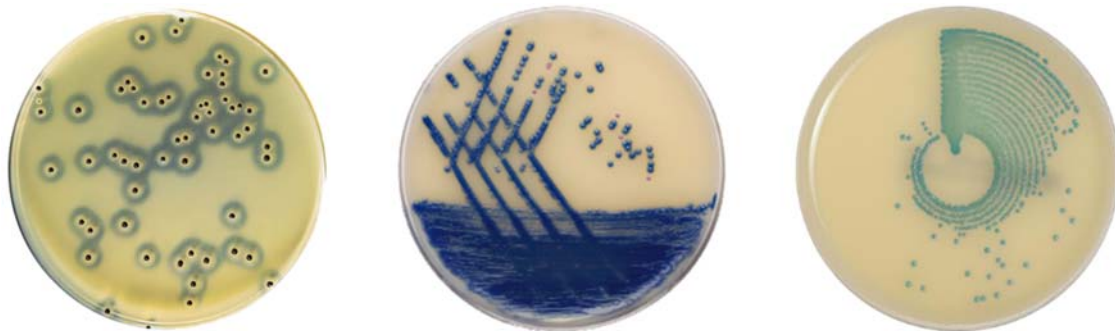


Figura 10.1. Evaluarea mediilor cromogene pentru detectarea MRSA: mediul Baird Parker (partea stângă), Brilliance MRSA 2 Agar (centru) și MRSA ChromID Agar (partea dreaptă) (www.oxid.com; www.biomerieux.com)

Rezultate și discuții

Studiile au arătat că nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între confirmarea MRSA prin *mecA/mecC* PCR și în cazul ambelor medii cromogene ($p = 0,013$ pentru Brilliance MRSA 2 agar și $p = 1,000$ pentru ChromID MRSA agar). În schimb, o diferență semnificativă din punct de vedere statistic a fost observată între rezultatele obținute de ambele medii cromogene ($p = 0,003$). ChromID MRSA agar a arătat valori mai bune ale performanței (sensibilitate și specificitate) decât Brilliance MRSA 2 agar (Tabelul 10.1): 83 și 84 din 85 MRSA *mecA/mecC* pozitiv au fost detectate prin Brilliance MRSA 2 agar și respectiv MRSA ChromID agar, la o sensibilitate de 97,7% și 98,8%. Specificitatea generală a fost, de asemenea, mai mare pentru ChromID MRSA agar (100% față de 92,9%) (Tabelul 10.1). Remarcabil, ambele medii cromogenice au fost capabile să detecteze tulpinile de MRSA *mecC*-pozitiv.

Tabelul 10.1. Performanța comparativă a diagnosticului mediilor cromogene Brilliance MRSA 2 agar și MRSA ChromID agar, pentru detectarea izolatelor provenite de la animale, probe de alimente sau izolate clinice

Performanță*	Izolate clinice (n=70)		Izolate de la animale (n=48)		Izolate prin probe de alimente (n=121)	
	Brilliance	Chrom ID	Brilliance	Chrom ID	Brilliance	Chrom ID
Pozitiv	67	68	4	4	12	12
False negativ	1	0	0	0	1	1
Negativ	2	2	44	44	96	108
Fals pozitiv	0	0	0	0	12	0
Sensibilitate	98,5	100	100	100	92,3	92,3
Specificitate	100	100	100	100	88,9	100
PPV	100	100	100	100	50,0	100
NPV	66,7	100	100	100	99,0	99,1

Notă: *PPV- valori pozitive predictive; NPV- valori negative predictive.

Analiza segregată a rezultatelor în funcție de originea izolatelor (clinice, animale și produse alimentare) a demonstrat că performanța pentru izolatele clinice și animale a fost excelentă indiferent de mediul cromogen utilizat (de exemplu, 100% specificitate și sensibilitate în probele de animale și 100% specificitate și sensibilitate sau 100% și 98,5% în probele clinice prin utilizarea mediului cromogen ChromID MRSA, respectiv, Brilliance MRSA 2 agar). Aceste rezultate sunt similare cu cele obținute anterior în probele clinice (McElhinney *et al.*, 2013; Veenemans *et al.*, 2013). Cu toate acestea, s-a observat o performanță semnificativ mai scăzută în confirmarea izolatelor MRSA din alimente utilizând Brilliance MRSA 2 agar în comparație cu confirmarea MRSA pe bază de PCR ($p=0,003$) sau ChromID MRSA agar ($p=0,001$). În plus, rezultatele obținute prin utilizarea Brilliance MRSA 2 agar în izolatele derivate din alimente diferă semnificativ de cele obținute în izolatele clinice și animale ($p=0,0001$).

Interesant, majoritatea valorilor fals pozitive prin utilizarea Brilliance MRSA 2 agar au fost detectate în probele de lapte și brânză, indiferent de perioada de izolare sau de originea geografică (10 din 12 fals negative, 83,3%). O constatare remarcabilă este că sensibilitatea obținută în probele de alimente de ambele mediile cromogene nu a fost 100%, deoarece în ambele cazuri a fost o probă identificată ca fals negativă. Acest izolat particular aparține unui nou tip MRSA emergent: OS-MRSA, care conține *mecA*, dar este sensibil atât la cefoxitină cât și la oxacilină.

În concluzie, utilizarea plăcilor cu agar cromogen pentru confirmarea MRSA a izolatelor de *S. aureus* poate oferi o bună performanță de diagnostic, indiferent de tipul de mediu cromogen utilizat sau de originea izolatelor *S. aureus*. Cu toate acestea, rezultatele noastre au arătat o performanță mai scăzută a diagnosticului pentru confirmarea tulpinilor de MRSA provenite din probele de alimente de origine animală prin utilizarea mediului Brilliance MRSA 2 agar. Acest fapt ar trebui luat în considerare la proiectarea screening-ului MRSA pentru probele de alimente și tulpinile izolate din mediul fabricilor de procesare a alimentelor asociate.

Concluzii Generale

Activitățile de cercetare realizate în această teză de doctorat s-au axat pe analiza tulpinilor de MRSA izolate din alimente de origine animală, produse în casă sau la nivel industrial, introduse ilegal în UE din țări care nu au aderat la această comunitate. Pe baza rezultatelor obținute, au fost formulate mai multe concluzii:

- ◆ Prevalența crescută a bacteriei *Staphylococcus aureus* (14,1%) și MRSA (2,5%) în alimente evidențiază riscul potențial generat asupra consumatorilor, cauzat de introducerea în UE a produselor alimentare, pe cale ilegală, prin diferite rute, cum ar fi aeroporturile sau frontierele terestre;
- ◆ Prezența tulpinilor enterotoxigenice HA-, CA- și LA-MRSA identificate în alimentele de origine animală introduse ilegal în UE nu trebuie neglijată, deoarece rolul lor patogen nu este cunoscut;
- ◆ Activarea enterotoxinelor clasice și prezența lor potențială în produsele transportate de călători în bagajele lor nu ar trebui ignorate;
- ◆ Detectarea liniilor genealogice distincte asociate animalelor (ST398-MRSA-V) sau comunităților (ST8-MRSA-IV/V și ST1649-MRSA-IV) subliniază faptul că importul ilegal de alimente de origine animală constituie căi de transmisie a bacteriei *S. aureus* rezistentă la antibiotice;
- ◆ A fost izolată pentru prima oară o tulpină ST5-OS-MRSA-V (OS-MRSA 41) asociată cu un produs procesat de origine animală, transportat ilegal de către un pasager din Turcia către aeroportul din Viena. Analiza WGS a arătat că mai multe mutații în genele de rezistență *mecA* și *blaZ* ar putea fi responsabile pentru nivelul scăzut de concentrație minimă inhibitorie a oxacilinei în background-ul genetic al acestei tulpini;
- ◆ A fost evaluată capacitatea tulpinilor de *S. aureus* și MRSA de a forma biofilme, evidențiind faptul că acestea pot adera moderat sau puternic pe suprafețe;
- ◆ S-au observat diferite capacități de aderare a biofilmelor, în funcție de liniile genealogice ale tulpinilor de MRSA analizate, unde producție mai mare de biomasă s-a observat în cazul acelor tulpini care posedă SCC*mec* type IV;
- ◆ Utilizarea metodelor microbiologice convenționale a fost urmată de tehnicile de detecție moleculară, mai sensibile, pentru validarea și/sau evidențierea tiparelor genetice în rândul tulpinilor analizate;
- ◆ Performanța scăzută a mediului cromogen Brilliance MRSA 2 în ceea ce privește confirmarea tulpinilor de MRSA izolate din produsele alimentare, indică faptul că

utilizarea exclusivă a metodelor convenționale ar putea duce la rezultate fals pozitive;

- ◆ Necesitatea unor măsuri eficiente la punctele de control la frontieră este imperativă pentru reducerea prevalenței și diseminării MRSA legate de materiile prime provenite de la animale și alimentele asociate.

Rezumând, epidemiile ar putea fi detectate din timp dacă s-ar aplica strategii holistice, care să cuprindă toate aspectele relevante ale lanțului alimentar în ansamblu, de la producția primară la consumatorii finali.

Prin cercetarea realizată, am demonstrat necesitatea efectuării unor astfel de studii pentru a caracteriza tulpinile de MRSA izolate din alimente din punct de vedere fenotipic și genotipic, pentru a îmbunătăți programele de prevenire/control și supraveghere. Mai mult, cercetarea deschide noi direcții pentru fabricile de procesare a alimentelor, contribuind la îmbunătățirea siguranței și igienei alimentare.

Dincolo de aspectele științifice, această teză contribuie la baza de date globală privind epidemiologia lui *Staphylococcus aureus* rezistent la antimicrobiene.

Contribuții originale

În urma rezultatelor obținute în prezenta teză, am contribuit la extinderea cunoștințelor actuale legate de *Staphylococcus aureus* și rezistența lui antimicrobiană, prin următoarele elemente cheie:

- ◆ Evaluarea pentru prima dată a lui *S. aureus* privind introducerea în UE prin importuri necontrolate (cum ar fi alimentele neprocesate și RTE colectate fie din aeroporturi, fie de la granițele terestre ale UE);
- ◆ Raportarea pentru prima dată a prezenței tulpinilor HA-, CA- și LA-MRSA în produsele alimentare confiscate de la călători venind din țări non-UE;
- ◆ Raportarea pentru prima dată a unei tulpini ST5-OS-MRSA-V asociată cu un produs alimentar procesat. Această constatare evidențiază rolul potențial al alimentelor ca pe o rută de diseminare a acestei noi variante emergente de MRSA;
- ◆ Analiza comparativă a genomului tulpinii OS-MRSA cu alte tulpini de *S. aureus* deja publicate în literatură;
- ◆ Caracterizarea matricelor biofilmelor formate de tulpini *S. aureus* prin teste chimice și enzimatic, raportând că proteinele au fost principala sursă pentru menținerea structurii biofilmelor formate de către tulpinile *S. aureus* izolate din surse alimentare (confirmate prin teste CLSM). Astfel de studii sunt necesare deoarece pot fi dezvoltate soluții de curățare adaptate pentru diferite suprafețe întâlnite în fabrici;
- ◆ Compararea caracteristicilor genotipice ale tulpinilor izolate de MRSA cu capacitatea lor de a forma biofilme, în care am confirmat că acele casete SCCmec

mai mici conferă tulpinilor care le posedă o capacitate mai mare de formare a biofilmelor;

- ◆ Demonstrarea necesității utilizării unor tehnici de biologie moleculară, cum ar fi PFGE sau MLST, pentru evidențierea relațiilor genetice care ar putea exista între izolatele de MRSA analizate. Rezultatele obținute au contribuit la îmbunătățirea bazei de date cu privire la acest agent patogen alimentar, relația genetică existentă între izolate, dar și la compararea profilurilor alelice cu datele disponibile în baza de date MLST ale *S. aureus* în scopuri de trasabilitate;
- ◆ Gestionarea diferitelor instrumente de secvențiere și bioinformatică pentru analiza și interpretarea datelor obținute în teza de față;
- ◆ Confirmarea rolului potențial al produselor alimentare în prevalența și diseminarea cu succes a diferitelor linii ale MRSA în rândul alimentelor introduse și vândute ilegal în UE;
- ◆ Necesitatea implementării programelor de supraveghere a lanțului alimentar din România, în cazul apariției unei epidemii precoce provocat de clonele asociate animalelor;
- ◆ Cercetarea realizată în actuala teză de doctorat deschide noi direcții privind modul în care MRSA trebuie privit din perspectiva siguranței alimentare, în timp ce programele de monitorizare și supraveghere nu ar trebui privite ca fiind opționale, ci ca fundamentale pentru controlul MRSA.

Perspectivă viitoare de cercetare

- ◆ Corelarea caracteristicilor genotipice ale izolatelor MRSA analizate cu susceptibilitatea acestora la uleiuri esențiale și extracte din plante;
- ◆ Evaluarea activității unor astfel de compuși alternativi (uleiuri esențiale și extracte diferite) împotriva biofilmelor formate de tulpini MRSA;
- ◆ Evaluarea acoperirilor alternative (bazate pe nanoparticule de oxid de zinc) asupra inhibării tulpinilor de *S. aureus* de a adera și forma biofilme;
- ◆ Evaluarea riscului produs de *S. aureus* și a rezistenței sale antimicrobiene de-a lungul lanțului alimentar din România;

Bibliografie selectivă

1. Alföldi, J., Lindblad-toh, K., & Alfo, J. (2013). Comparative Genomics as a Tool to Understand Evolution and Disease. *Genome Research*, **23**, 1063–1068. <https://doi.org/10.1101/gr.157503.113>
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**(3), 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
3. Andrade-Figueiredo, M., & Leal-Balbino, T. C. (2016). Clonal Diversity and Epidemiological Characteristics of *Staphylococcus aureus*: High Prevalence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Clinical Isolates in Brazil. *BMC Microbiology*, **16**(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>
4. Argudín, M. A., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A., Schroeter, A., Guerra, B. (2011). Virulence and Resistance Determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 Isolates from Nonhuman Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(9), 3052–3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-10>

5. Ariza-Miguel, J., Oniciuc, E.-A., Sanz, I., Fernández-Natal, I., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Evaluation of Two Commercially Available Chromogenic Media for Confirmation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Human, Animal, and Food Samples. *International Journal of Food Microbiology*, **209**. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.004>
6. Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Larner-Svensson, H., Johansen, H. K., Westh, H. (2014). *spa*-Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Comparing Whole Genome Sequencing with Sanger Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**(12), 4305–4308. <https://doi.org/10.1128/JCM.01979-14>
7. Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., & La Salandra, G. (2017). Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Milk and Dairy Products in South Italy. *Food Microbiology*, **62**, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.020>
8. Bhargava, K., Wang, X., Donabedian, S., Zervos, M., da Rocha, L., & Zhang, Y. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerging Infectious Diseases*, **17**(6), 1135–1137. <https://doi.org/10.3201/eid1706.101095>
9. Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., & Briandet, R. (2010). The Biofilm Architecture of Sixty Opportunistic Pathogens Deciphered Using a High Throughput CLSM Method. *Journal of Microbiological Methods*, **82**(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
10. Carfora, V., Caprioli, A., Marri, N., Sagrafoli, D., Boselli, C., Giacinti, G., Amatiste, S. (2015). Enterotoxin Genes, Enterotoxin Production, and Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy Products in Central Italy. *International Dairy Journal*, **42**, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.009>
11. Cassat, J. E., Hammer, N. D., Campbell, P. J., Benson, M. A., Perrien, D. S., Mrak, L. N., Skaar, E. P. (2013). A Secreted Bacterial Protease Tailors the *Staphylococcus aureus* Virulence Repertoire to Modulate Bone Remodeling during Osteomyelitis. *Cell Host Microbe*, **13**(6), 759–772. <https://doi.org/10.1038/nm1636.Mutational>
12. Castillo, D., Christiansen, R. H., Dalsgaard, I., & Madsen, L. (2016). Insights Into the Pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS ONE*, **11**(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152515>
13. Chen, F. J., Huang, I. W., Wang, C. H., Chen, P., Wang, H. Y., Lai, J. F., Lauderdale, T. L. Y. (2012). *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with Low-Level Oxacillin MIC in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**(5), 1679–1683. <https://doi.org/10.1128/JCM.06711-11>
14. Chen, P., Abercrombie, J. J., Jeffrey, N. R., & Leung, K. P. (2012). An Improved Medium for Growing *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, **90**(2), 115–118. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.009>
15. Chua, K. Y. L., Stinear, T. P., & Howden, B. P. (2013). Functional Genomics of *Staphylococcus aureus*. *Briefings in Functional Genomics*, **12**(4), 305–315. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt006>
16. Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., and Collaborators from the Multi Laboratory project, Adamsson, I., Villari, P. (2000). Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Comparison of Results Obtained in a Multi Laboratory Effort Using Identical Protocols and MRSA Strains. *Microbial Drug Resistance*, **6**(3), 189–198.
17. Ciolacu, L., Stessl, B., Bolocan, A. S., & Oniciuc, E.-A. (2016). Tracking Foodborne Pathogenic Bacteria in Raw and Ready-to-Eat Food Illegally Sold at the Eastern EU Border. *Foodborne Pathogens and Disease*, **13**(3), 148–155. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2057>
18. Conceição, T., Coelho, C., Lencastre, H. de, & Aires-De-Sousa, M. (2015). Frequent Occurrence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Strains in Two African Countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**(August), 3200–3204. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv261>
19. Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G., & Louie, M. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) in Food Samples Associated with Foodborne Illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiology*, **32**(1), 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.012>
20. De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Wit, B., Huijsdens, X. W., de Neeling, A. J., Bosch, T., Heuvelink, A. E. (2009). Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat. *International Journal of Food Microbiology*, **134**(1–2), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007>
21. EC 206/2009 on the introduction into the Community of personal consignments of products of animal origin and amending Regulation (EC) No 136/2004. (2009). *Official Journal of the European Union*.
22. EC 275/2007 concerning lists of animals and products to be subject to controls at border inspection posts under Council Directives 91/496/EEC and 97/78/EC. (2007). *Official Journal of the European Union*, **2007**(301), 9–33.

23. EFSA. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15th November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, **L338**, 1–26.
24. EFSA & ECDPC. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, **12**(2), 1–312. <https://doi.org/doi:10.2903/j.efsa.2012.2597>
25. European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Annual Epidemiological Report 2013: Reporting on 2011 Surveillance Data and 2012 Epidemic Intelligence Data. <https://doi.org/10.2900/76137>
26. Ferreira, A. A., Tette, P. A. S., Mendonça, R. C. S., Soares, A. D. S., & Carvalho, M. M. De. (2014). Detection of Exopolysaccharide Production and Biofilm-Related Genes in *Staphylococcus* spp. Isolated from a Poultry Processing Plant. *Food Science and Technology*, **34**(4), 710–716. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6446>
27. Ferreira, F. A., Souza, R. R., Bonelli, R. R., Américo, M. A., Fracalanza, S. E. L., & Figueiredo, A. M. S. (2012). Comparison of *in vitro* and *in vivo* Systems to Study *ica*-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, **88**(3), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.007>
28. Foulston, L., Elsholz, A. K. W., DeFrancesco, A. S., & Losick, R. (2014). The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. *mBio*, **5**(5), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01667-14>
29. Fratamico, P. M., Annous, B. A., & Guenther, N. W. (2009). *Biofilms in the Food and Beverage Industries (1st Editio)*. Oxford; Cambridge; Philadelphia; New Delhi: Woodhead Publishing Limited. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/biofilms-in-the-food-and-beverage-industries/fratamico/978-1-84569-477-7>
30. Freitas, A. I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., & Cerca, N. (2014). Optimization of An Automatic Counting System for The Quantification of *Staphylococcus epidermidis* Cells in Biofilms. *Journal of Basic Microbiology*, **54**(7), 750–757. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200603>
31. Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Progress in Natural Science*, **18**(9), 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>
32. Gharsa, H., Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Gomez-Sanz, E., Lozano, C., Jouini, A., Torres, C. (2012). High Diversity of Genetic Lineages and Virulence Genes in Nasal *Staphylococcus aureus* Isolates from Donkeys Destined to Food Consumption in Tunisia with Predominance of the Ruminant Associated CC133 Lineage. *BMC Veterinary Research*, **8**, 203. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-203>
33. González-Zorn, B., & Escudero, J. A. (2012). Ecology of Antimicrobial Resistance: Humans, Animals, Food and Environment. *International Microbiology*, **15**(3), 101–109. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.163>
34. Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, **46**(5), S350–S359. <https://doi.org/10.1086/533591>
35. Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). CRISPRcompar: A Web Tool to Identify Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *Nucleic Acids Research*, **36**(Web Server issue), 52–57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn228>
36. Haran, K. P., Godden, S. M., Boxrud, D., Jawahir, S., Bender, J. B., & Sreevatsan, S. (2012). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**(3), 688–695. <https://doi.org/10.1128/JCM.05214-11>
37. Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., & Pyörälä, S. (2007). Virulence Genes of Bovine *Staphylococcus aureus* from Persistent and Nonpersistent Intramammary Infections with Different Clinical Characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(4), 993–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>
38. Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**(4), 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
39. Hososaka, Y., Hanaki, H., Endo, H., Suzuki, Y., Nagasawa, Z., Otsuka, Y., Sunakawa, K. (2007). Characterization of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus*: A New Type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **13**(2), 79–86. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0502-7>
40. Jackson, C. R., Davis, J. A., & Barrett, J. B. (2013). Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Retail Meat and Humans in Georgia. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(4), 1199–1207. <https://doi.org/10.1128/JCM.03166-12>
41. Jones, T. F., Kellum, M. E., Porter, S. S., Bell, M., & Schaffner, W. (2002). An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, **8**(1), 82–84. <https://doi.org/10.3201/eid0801.010174>

42. Jusko, M., Potempa, J., Kantyka, T., Bielecka, E., Miller, H., & Kalinska, M. (2014). Staphylococcal Proteases Air in Evasion of the Human Complement System. *Journal of Innate Immunity*, **6**(1), 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
43. Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, **2014**, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>
44. Kluytmans, J. (2010). MRSA in Food Products: Cause for Concern or Case for Complacency? *Clinical Microbiology and Infection*, **16**, 11–15.
45. Kluytmans, J., Leeuwen, W. Van, Goessens, W., Hollis, R., Messer, S., Kluytmans, J. a N., Belkum, A. Verbruch, H. (1995). Food-Initiated Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Analyzed by Pheno- and Genotyping, *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(5), 1121–1128.
46. Kumar, V. A., Steffy, K., Chatterjee, M., Sugumar, M., Dinesh, K. R., Manoharan, A., Biswas, R. (2013). Detection of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Isolates by Use of Chromogenic Medium MRSA ID. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(1), 318–319. <https://doi.org/10.1128/JCM.01040-12>
47. Larsen, J., Andersen, P. S., Winstel, V., & Peschel, A. (2017). *Staphylococcus aureus* CC395 Harbours a Novel Composite Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Element. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**(January), 1002–1005. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw544>
48. Lowder, B. V., Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Weinert, L. A., Conway-Morris, A., Cartwright, R. A., Fitzgerald, J. R. (2009). Recent Human-to-Poultry Host Jump, Adaptation, and Pandemic Spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **106**(46), 19545–19550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909285106>
49. Lozano, C., López, M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., & Zarazaga, M. (2009). Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Food Samples of Animal Origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**(6), 1325–1326. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp378>
50. Luong, T. T., Lei, M. G., & Lee, C. Y. (2009). *Staphylococcus aureus* Rbf Activates Biofilm Formation in vitro and Promotes Virulence in a Murine Foreign Body Infection Model. *Infection and Immunity*, **77**(1), 335–340. <https://doi.org/10.1128/IAI.00872-08>
51. Malhotra-Kumar, S., Abrahantes, C., Sabiiti, W., Lammens, C., Vercauteren, G., Ieven, M., Aerts, M. (2010). Evaluation of Chromogenic Media for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**(4), 1040–1046. <https://doi.org/10.1128/JCM.01745-09>
52. McElhinney, R., Millar, C., & Scopes, E. (2013). A Comparative Evaluation of ChromID MRSA agar and Brilliance 2 MRSA Agar for Detection of MRSA in Clinical Samples. *British Journal of Biomedical Science*, **70**(1), 41–43.
53. Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lasa, I. (2009). Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **191**(3), 832–843. <https://doi.org/10.1128/JB.01222-08>
54. Miko, B. A., Hafer, C. A., Lee, C. J., Sullivan, S. B., Hackel, M. A. M., Johnson, B. M., Lowy, F. D. (2013). Molecular Characterization of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in the United States, 2004 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(3), 874–879. <https://doi.org/10.1128/JCM.00923-12>
55. Milheirico, C., Oliveira, D. C., & de Lencastre, H. (2007). Multiplex PCR Strategy for Subtyping the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IV in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: “SCC*mec* IV Multiplex.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **60**(1), 42–48. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm112>
56. Mirani, Z. A., Aziz, M., Khan, M. N., Lal, I., Hassan, N. ul, & Khan, S. I. (2013). Biofilm Formation and Dispersal of *Staphylococcus aureus* Under the Influence of Oxacillin. *Microbial Pathogenesis*, **61–62**, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.002>
57. Noordhuizen, J., Surborg, H., & Smulders, F. J. M. (2013). On the Efficacy of Current Biosecurity Measures at EU Borders to Prevent the Transfer of Zoonotic and Livestock Diseases by Travelers. *Veterinary Quarterly*, **33**(3), 161–71. <https://doi.org/10.1080/01652176.2013.826883>
58. Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., Celano, G. V. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **117**(2), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006>
59. Ogata, K., Narimatsu, H., Suzuki, M., Higuchi, W., Yamamoto, T., & Taniguchi, H. (2012). Commercially Distributed Meat as a Potential Vehicle for Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(8), 2797–2802. <https://doi.org/10.1128/AEM.07470-11>

60. Ohbayashi, T., Irie, A., Murakami, Y., Nowak, M., Potempa, J., Nishimura, Y., Imamura, T. (2011). Degradation of Fibrinogen and Collagen by Staphopains, Cysteine Proteases Released from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **157**(3), 786–792. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044503-0>
61. Oniciuc, E.-A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.-S., Diez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Foods from Black Market at EU Border as a Neglected Route of Potential Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission. *International Journal of Food Microbiology*, **209**, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.015>
62. Oniciuc, E.-A., Nicolau, A. I., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2017). Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Food Chain. *Trends in Food Science & Technology*, **61**, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.002>
63. Oniciuc, E. A., Cerca, N., & Nicolau, A. I. (2016). Compositional Analysis of Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources. *Frontiers in Microbiology*, **7**:390, 2014–2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00390>
64. Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., & Galvez, A. (2010). Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*, **2**(8), 2117–2131. <https://doi.org/10.3390/toxins2082117>
65. Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* Toxins. *Current Opinion in Microbiology*, **17**(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>
66. Oyarzabal, O. A., & Kathariou, S. (2014). *DNA Methods in Food Safety*. Wiley Blackwell
67. Pagedar, A., Singh, J., & Batish, V. K. (2010). Surface Hydrophobicity, Nutritional Contents Affect *Staphylococcus aureus* Biofilms and Temperature Influences Its Survival in Preformed Biofilms. *Journal of Basic Microbiology*, **50**(SUPPL. 1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000034>
68. Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2009). Characterization for Enterotoxin Production, Virulence Factors, and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Various Foods in Portugal. *Food Microbiology*, **26**(3), 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.008>
69. Pournaras, S., Stathopoulos, C., & Tsakris, A. (2013). Oxacillin-Susceptible MRSA: Could It Become a Successful MRSA Type? *Future Microbiology*, **8**(11), 1365–1367. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.118>
70. Prokešová, L., Potužníková, B., Potempa, J., Zikán, J., Radl, J., Hachová, L., John, C. (1992). Cleavage of Human Immunoglobulins by Serine Proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunology Letters*, **31**(3), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(92\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0165-2478(92)90124-7)
71. Pu, S., Han, F., & Ge, B. (2009). Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Louisiana Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(1), 265–267. <https://doi.org/10.1128/AEM.01110-08>
72. Pu, W., Su, Y., Li, J., Li, C., Yang, Z., Deng, H., & Ni, C. (2014). High Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. *PLoS ONE*, **9**(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134>
73. Raji, M. A., Garaween, G., Ehrlich, R., Monecke, S., Shibl, A. M., & Senok, A. (2016). Genetic Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Retail Meat in Riyadh, Saudi Arabia. *Frontiers in Microbiology*, **7**(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00911>
74. Rice, K., Peralta, R., Bast, D., Azavedo, J. De, & McGavin, M. J. (2001). Description of *Staphylococcus* Serine Protease (ssp) Operon in *Staphylococcus aureus* and Nonpolar Inactivation of sspA- Encoded Serine Protease. *Infection and Immunity*, **69**(1), 159–169. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.159>
75. Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Diez-Valcarce, M., Fernandez-Natal, I., Hernandez, M., & Rovira, J. (2015). Foods Confiscated from Non-EU Flights as a Neglected Route of Potential Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission. *International Journal of Food Microbiology*, **209**, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.016>
76. Rosengren, Å., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., & Lindqvist, R. (2010). Occurrence of Foodborne Pathogens and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Cheese Produced on Farm-Dairies. *International Journal of Food Microbiology*, **144**(2), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004>
77. Sabat, A. J., Pournaras, S., Akkerboom, V., Tsakris, A., Grundmann, H., & Friedrich, A. W. (2015). Whole-Genome Analysis of An Oxacillin-Susceptible CC80 *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolate: Insights Into The Mechanisms of Cryptic Methicillin Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**(11), 2956–2964. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv210>

78. Saeed, K., Ahmad, N., Dryden, M., Cortes, N., Marsh, P., Sitjar, A., Green, S. (2014). Oxacillin-Susceptible Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a Hidden Resistant Mechanism Among Clinically Significant Isolates in the Wessex Region/UK. *Infection*, **42**(5), 843–847. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0641-1>
79. Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2013). Dispersal of Bap-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm by Proteinase K. *The Journal of Antibiotics*, **66**(2), 55–60. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.98>
80. Skogman, M. E., Vuorela, P. M., & Fallarero, A. (2012). Combining Biofilm Matrix Measurements with Biomass and Viability Assays in Susceptibility Assessments of Antimicrobials Against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *The Journal of Antibiotics*, **65**(9), 453–459. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.49>
81. Spanu, V., Spanu, C., Virdis, S., Cossu, F., Scarano, C., & De Santis, E. P. L. (2012). Virulence Factors and Genetic Variability of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Raw Sheep's Milk Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **153**(1–2), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.015>
82. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. (2014). Protein-Based Biofilm Matrices in Staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 171, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00171>
83. Standard, I. (2003). ISO 6888-2: 1999/Amd. 1:2003- Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff- Horizontal Method for The Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species), 2003.
84. Sun, J., Yang, M., Sreevatsan, S., & Davies, P. R. (2015). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Growing Pigs in the USA. *PLoS ONE*, **10**(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143670>
85. Syne, S.-M., Ramsubhag, A., & Adesiyun, A. (2013). Microbiological Hazard Analysis of Ready-To-Eat Meats Processed at a Food Plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology and Epidemiology*, **3**, 1–12. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.20450>
86. Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>
87. Vanhomerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J. P., De Greve, H., Malhotra-Kumar, S. (2014). Comparison of Biofilm Formation Between Major Clonal Lineages of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, **9**(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104561>
88. Vázquez-Sánchez, D., López-Cabo, M., Saá-Ibusquiza, P., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2012). Incidence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Fishery Products Marketed in Galicia (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, **157**(2), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.021>
89. Veenemans, J., Verhulst, C., Punselie, R., Van Keulen, P. H. J., & Kluytmans, J. A. J. W. (2013). Evaluation of Brilliance MRSA 2 Agar for Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(3), 1026–1027. <https://doi.org/10.1128/JCM.02995-12>
90. Verkade, E., Bosch, T., Hendriks, Y., & Kluytmans, J. (2012). Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch Nursing Home. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **33**(6), 624–626. <https://doi.org/10.1086/665726>
91. Verkade, E., Ferket, M., & Kluytmans, J. (2011). Clinical Evaluation of Oxoid Brilliance MRSA Agar in Comparison with bioMérieux MRSA ID Medium for Detection of Livestock-Associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, **60**(7), 905–908. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021964-0>
92. Voelk, V., Graber, H. U., van den Borne, B. H. P., Sartori, C., Steiner, A., Bodmer, M., & Haerdi-Landerer, M. C. (2014). A Longitudinal Study Investigating the Prevalence of *Staphylococcus aureus* Genotype B in Seasonally Communal Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, **97**:1-9, 4184–4192. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7291>
93. Walcher, G., Gonano, M., Kümmel, J., Barker, G. C., Lebl, K., Bereuter, O., Stessl, B. (2014). *Staphylococcus aureus* Reservoirs During Traditional Austrian Raw Milk Cheese Production. *The Journal of Dairy Research*, **81**(4), 462–470. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000417>
94. Wulf, M. W. H., Markestein, A., van der Linden, F., Voss, A., Klaassen, C., & Verduin, C. (2008a). First Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch Hospital, June 2007. *Euro Surveillance*, **13**(1–3), 1–2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01927.x>
95. Zarei, M., Maktabi, S., & Ghorbanpour, M. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. in Seafood Products using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, **9**(2), 108–112. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0989>

Lista lucrărilor publicate și prezentate la evenimente științifice

Articole publicate în reviste cotate ISI

Rodríguez-Lázaro, D., **Oniciuc, E.-A.**, González García, P., Gallego, D., Fernández-Natal, I., Dominguez-Gil, M., Eiros-Bouza, J.S., Wagner, M., Nicolau, A.I., Hernández, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* crosses EU borders via uncontrolled imported food. *Frontiers in Microbiology*. Impact factor: 4.165, *accepted for publishing*

Oniciuc, E.-A., Nicolau, A.I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. (2017). Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, [doi: 10.1016/j.tifs.2016.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.002). Factor de impact: 5.150

Oniciuc, E.A., Cerca, N., Nicolau, A.I. (2016). Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Frontiers in Microbiology*, 7:390, [doi:10.3389/fmicb.2016.00390](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00390). Factor de impact: 3.989

Ciolacu, L., Stessl, B., Bolocan, A.S., **Oniciuc, E.A.**, Wagner, M., Rychli, B., Nicolau, A.I. (2016). Tracking foodborne pathogenic bacteria in raw and ready-to-eat food illegally sold at the Eastern EU border. *Foodborne Pathogens and Disease*, [doi:10.1089/fpd.2015.2057](https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2057). Factor de impact: 1.905

Ariza-Miguel, J., **Oniciuc, E.A.**, Sanz, I., Fernández-Natal, I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Evaluation of two commercially available chromogenic media for confirmation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human, animal, and food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 209: 26-28, [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.004). Factor de impact: 3.082

Oniciuc, E.A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.S., Diez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A.I., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *International Journal of Food Microbiology*, 209: 34-38, [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.015). Factor de impact: 3.082

Conferințe internaționale

Oniciuc, E.A., Bucur, F.I., Rodríguez Lázaro, D., Barbu, V., Hernandez, M., Nicolau, A.I.- Correlation between biofilm formation and composition and molecular aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Congress**, 09-13/07/2017, Valencia, Spain

Rodríguez Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., **Oniciuc, E.A.**, Nicolau, A.I., Rovira, J., Wagner, M., Fernández Natal, I., Hernandez, M.- Evidence on an emerging risk associated with the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the food chain. **Food Micro Conference**, 19-22/07/2016, Dublin, Ireland

Oniciuc, E.A., Bolocan, A.S., Fotin, A.A., Dajbog, A., Nicolau, A.- Comparative assessment of disk diffusion and micro dilution methods using CLSI guidelines for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Food Safety Congress**, 07-08/05/2015, Istanbul, Turkey

Conferințe naționale

Oniciuc, E.A., Martín Quijada, N., Nicolau, A.I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D.- Comparative genomic analysis for understanding evolution of MRSA Strains. Scientific **Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati**, 5th edition, 08-09/06/2017, Galati, Romania

Oniciuc, E.A., Nicolau, A.I.- Protein based matrices evidenced in biofilm structure of *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. Scientific **Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati**, 4th edition, 02-03/06/2016, Galati, Romania

Fernández Natal, I., Ariza Miguel, J., **Oniciuc, E.A.**, Nicolau, A.I., Rovira Carballido, J., Wagner, M., Hernandez, M., Rodríguez Lázaro, D.- Descripción del primer caso de la variante OXA sensible de una cepa de MRSA aislada en alimentos. **XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 26-28/05/2016, Barcelona, Spain

Fotin, A.A., **Oniciuc, E.A.**, Nicolau, A.- Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal origin foods sold in an open market. **Scientific Session for Students**, Faculty of Food Science and Engineering, 22/05/2015, Galati, Romania

Oniciuc, E.A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.S., Diez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A.I., Rodríguez-Lázaro, D.- Incidence of *Staphylococcus aureus* in food products illegally sold in a Romanian market and characterization of the isolated strains. **Scientific Conference of Doctoral Schools from UDJ Galati**, 3rd edition, 04-05/06/2015, Galati, Romania

Proiecte

2015-2016- COST FA1202 project- A European Network For Mitigating Bacterial Colonisation and Persistence On Foods and Food Processing Environments

01/06/2014-31/12/2014- FP7th PROMISE project no 265877- Protection of consumers through mitigation of segregation of expertise (Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania)

Internship-uri

16/01/2017-15/04/2017- Erasmus internship- Whole genome sequencing analysis of an OS-MRSA strain associated with food (ITACyL and Universidad de Burgos, Spain)

01/12/2015-28/02/2016- Doctoral internship- Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from different neglected routes to Europe (FEMS grant- ITACyL and Universidad de Burgos, Spain)

01/10/2015-30/11/2015- Doctoral internship- Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from different neglected routes to Europe (international airports and open market close to EU borders) (COST FA1202 grant- ITACyL and Universidad de Burgos, Spain)

10/03/2015-30/04/2015- Doctoral internship- Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms by CLSM (COST FA1202 grant- Center of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal)

06/10/2014-12/12/2014- Doctoral internship- Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates by PFGE (PROMISE grant- Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain)

Workshop-uri

09/09/2016- One day Summer School- *In vitro/ In silico* approaches for food science (EFSA, Parma, Italy)

18/12/2014-19/12/2014- Workshop on sensible data produced by the PROMISE consortium with involved research partners and Food Safety Agencies (PROMISE consortium and AGES, Vienna, Austria)

Premii

Oniciuc, E.A., Martín Quijada, N., Nicolau, A.I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D.- Comparative genomic analysis for understanding evolution of MRSA Strains - **First prize** - Scientific Conference of Doctoral Schools from Dunarea de Jos University of Galati, 5th edition, 08-09/06/2017, Dunarea de Jos University of Galati, Romania

Oniciuc, E.A., Nicolau, A.I.- Protein based matrices evidenced in biofilm structure of *Staphylococcus aureus* isolated from food sources - **First prize**- Scientific Conference of Doctoral Schools from Dunarea de Jos University of Galati, 4th edition, 2-3/06/2016, Dunarea de Jos University of Galati, Romania

Oniciuc, E.A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.S., Diez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A.I., Rodríguez-Lázaro, D.- Incidence of *Staphylococcus aureus* in food products illegally sold in a Romanian market and characterization of the isolated strains- **Second prize**- Scientific Conference of Doctoral Schools from Dunarea de Jos University of Galati, 3rd edition, 4-5/06/2015, Dunarea de Jos University of Galati, Romania

Memberships

2015-Present- Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology

2014-Present- Romanian Society of Microbiology

2014-Present- Scientific Council of Doctoral School of Engineering (Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania)

Alte activități desfășurate în timpul stagiului doctoral

Articole publicate în reviste cotate ISI

Bleoanca, I., Saje, K., Mihalcea, L., **Oniciuc, E.A.**, Smole-Mozina, S., Nicolau, A.I., Borda, D. (2016). Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese- A hurdle approach. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 38:7-14, doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.002. Factor de impact: 2.997

Bolocan, A.S., Nicolau, A.I., Alvarez-Ordóñez, A., Borda, D., **Oniciuc, E.A.**, Stessl, B., Gurgu, L., Wagner, M., Jordan, K. (2016). Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. *Meat Science*, 113:26-34, [doi:10.1016/j.meatsci.2015.10.016](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.10.016). Factor de impact: 2.615

Bolocan, A.S., **Oniciuc, E.A.**, Alvarez-Ordóñez, A., Wagner, M., Rychli, K., Jordan, K., Nicolau, A.I. (2015). Putative cross-contamination routes of *Listeria monocytogenes* in a meat processing facility in Romania. *Journal of Food Protection*, 78 (9):1624-1769, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-539>. Factor de impact: 1.974

Capitole de carte

Bolocan, A.S., Ciolacu, L., **Oniciuc, E.A.**, Draper, L., Nicolau, A.I., Wagner, M., Hill, C.- Book chapter- Utilization of bacteriophages targeting *Listeria monocytogenes* in dairy and food industry. Apple Academic Press, Inc., *acceptat pentru publicare*

Conferințe internaționale

Bolocan, A.S., **Oniciuc, E.A.**, Alvarez-Ordóñez, A., Wagner, M., Rychli, K., Jordan, K., Borda, D., Nicolau, A.I.- What could explain contamination in a Romanian food processing environment?, **PROMISE Conference**- Sensible data: A challenge for Risk Communication?, 18-19/12/2014, Vienna, Austria

Nicolau, A.I., Bolocan, A.S., Rychli, K., **Oniciuc, E.A.**, Alvarez-Ordóñez, A., W Jordan, K., Wagner, M.- To be persistent or not to be persistent? That is the question for *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing environment. **General Assembly of the Hungarian Society for Microbiology**, 15-17/10/2014, Lake-Balaton, Hungary

Bolocan, A.S., Rychli, K., **Oniciuc, E.A.**, Wagner, M., Nicolau, A.I.- Genetic characterization of some *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing facility in relation to their tolerance to disinfectants. **Food Micro Conference**, 1-4/09/2014, Nantes, France

Conferințe naționale

Saje, K., **Oniciuc, E.A.**, Mihalcea, L., Coman, G., Bleoancă, I., Smole-Mozina, S., Nicolau, A.I., Borda, D.- Synergistic effect of high pressure processing and thyme extract on *Listeria monocytogenes* in fresh cheese. **7th International Symposium EuroAliment**, 24-26/09/2015, Galati, Romania

Proiecte

Present- SafeConsumE project- Safer food through changed consumer behavior: Effective tools and products, communication strategies, education and a food safety policy reducing health burden from foodborne illnesses (no. 727580/2017) (Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania)

Present- SafeFood project- Development of a novel industrial process for safe, sustainable and higher quality foods, using biotechnology and cybernetic approach (ERA-IB-16-014) (Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania)

2016- COST FA1408- A European Network for Foodborne Parasites (Euro-FBP)

Internship-uri

01/03/2016-15/04/2016- Doctoral internship- Screening and detection of *Toxoplasma gondii* in pig samples from slaughterhouses (COST FA1408- Universidad de Burgos, Spain)

Premii

Bolocan, A.S., Crăiță, A., Stângă, C.T., **Oniciuc, E.A.** -"Magic Bite product"-**Bronz medal**- UGAL INVENT, 8-10/10/2014, Dunarea de Jos University of Galati, Romania