

Modalități de instalare a rezistenței la antimicrobiene și studierea eficacității antimicrobielenor

Ways to install antimicrobial resistance and study the effectiveness of antimicrobials

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin, Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: *antiinfecțioase,*
Keywords: *anti-infective,*

Rezumat

Antibiorezistența a apărut mai ales prin folosirea antibioticelor ca biostimulatori, în conservarea alimentelor de natura animală sau cel mai des prin administrarea antibioticelor nerațional, fără rețetă și antibiogramă. Articolul prezintă modalitățile de instalare a rezistenței la antimicrobiene și evaluează eficacitatea antimicrobielenor (antibiotice și antifungice). Sunt prezentate principalele modalități de răspândire și instalare a rezistenței precum și urmările acesteia la nivel global, mecanismele transmiterii rezistenței în natură și testele de evaluare a eficacității antiinfecțioaselor (biologice, fizico-chimice, in vitro, tehnicile moleculare etc.).

Abstract

Antibiotic resistance has emerged mainly through the use of antibiotics as biostimulators, in the preservation of animal foods or most often through the administration of antibiotics irrationally, without a prescription and antibiogram. The article presents the ways to install antimicrobial resistance and evaluates the effectiveness of antimicrobials (antibiotics and antifungals). The main ways of spreading and installing resistance as well as its consequences globally, the mechanisms of transmission of resistance in nature and tests to evaluate the effectiveness of anti-infectives (biological, physico-chemical, in vitro, molecular techniques, etc.) are presented.

Introducere

Rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă o problemă majoră, cu implicații largi, fiind considerată un fenomen cu risc zoonotic.

Antimicrobienele au revoluționat practica medicală, astfel afecțiuni care în trecut erau mortale au devenit obișnuite și pot fi tratate în scurt timp. Acest avantaj, în prezent este supus riscului în special din cauza utilizării excesive sau inadecvate a antimicrobielenor, ceea ce a dus la creșterea cazurilor de apariție și de răspândire a bacteriilor multirezistente.

Germenii rezistenți sunt sau devin „indiferenți” („toleranți”) la antibiotice, ei sustrăgându-se prin variate modalități efectului antibacterian scontat, după administrarea de doze uzuale, netoxice. După expunerea la un

antibiotic, bacteria este selectată pentru rezistență rezultând astfel supravieuirea celor mai rezistente tulpini (FEDESA, 2000).

Deși s-a prevăzut evoluția rezistenței față de aceste medicamente, nu au fost intuite mecanismele prin care genele care conferă rezistență se vor răspândi. După Heinemann (1999), agenții antimicrobieni se apropie de sfarsitul eficienței lor.

RAM este o consecință a evoluției, a selecției naturale și mutației genetice, această mutație fiind ulterior transmisă conferind rezistență. Într-o lume unde nevoia de proteină de origine animală a crescut imens datorită creșterii logaritmice a populației, în mod logic și industria creșterii animalelor de rentă a beneficiat de uzul masiv al antibioticelor. Practicile de producție la animale au evoluat

de-a lungul anilor pentru a satisface această nevoie de proteine alimentare ale populației.

Astfel, fermele au devenit complexe foarte mari și au folosit intensiv practicile moderne de producție pentru a împinge ratele de creștere a animalelor de rentă către nivelul lor maxim.

De asemenea, rețelele practici și gestionarea incorectă au exacerbât situația existentă azi (WHO, 2002).

În ultimele decade, rezistența la produsele antiinfecțioase, antibiotice și antimicotice, a ocupat poziții dominante în preocupările legate de sănătatea publică din agenda Europeană.

Antibiorezistența a fost semnalată la câțiva ani, după ce, începând cu anii 50, antibioticele au început să fie utilizate în profilaxia și terapia bolilor infecțioase la animalele de fermă.

Acest fenomen s-a amplificat progresiv, ca urmare a utilizării (prima dată a tetraciclinelor, dar nu numai), ca promotori de creștere la păsări și suine. Consumul de antimicrobiene la animalele de la care se obțin produse alimentare este mult mai mare decât la oameni, atât în termeni de consum total, cât și în termeni de doze administrate în raport cu greutatea lor.

Agențiile europene au recunoscut că reducerea utilizării de antimicrobiene de uz veterinar este un deziderat pentru a limita RAM.

Conform unui raport ONU „*mediul natural devine un rezervor al reziduurilor de antibiotice, agenți patogeni rezistenți și alte molecule cu proprietăți antimicrobiene care sporesc răspândirea genelor rezistente în mediul microbial*” (1).

Un fapt esențial este că, animalele pot servi drept medii, rezervoare și diseminatori de tulpini rezistente și/sau ale genelor antibioretanței. Utilizarea imprudentă a antimicrobienele la animale alături de rețelele practici poate duce finalmente la creșterea morbidității și mortalității. Eficacitatea redusă a antibioticelor duce la creșterea costurilor de asistență medicală și a crescut mult potențialul pentru transportul și diseminarea agenților patogeni cu apariția facilitată de patogeni ai rezistenței

Parlamentul European a aprobat o serie de restricții privind utilizarea antibioticelor

pentru animalele de fermă sănătoase, în încercarea de a limita răspândirea bacteriilor rezistente la antibiotice. Noua legislație, care va fi implementată până în 2022, interzice utilizarea antibioticelor destinate oamenilor în medicina veterinară, precum și utilizarea fără prescripție medicală a antibioticelor pentru animale. Veterinarii vor fi nevoiți să ofere date privind vânzările de antibiotice, iar alimentele importate vor trebui să îndeplinească standardele UE (1).

Răspândirea și transmiterea genelor rezistenței este încrucișată (vezi fig. 1) și a fost deja demonstrată ca fiind posibilă între:

- om - animal
- animal – om
- animal – mediu

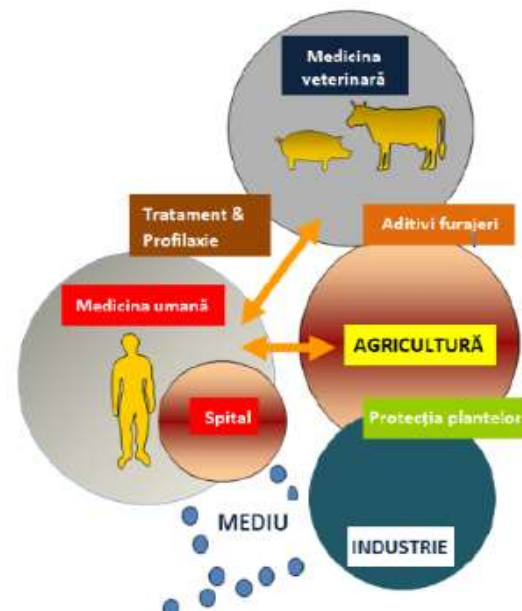


Figura 1. Răspândirea și transmiterea rezistenței

În acest sens este esențial să se rețină că în respectul One Health, un tratament antimicrobian veterinar durabil trebuie să fie legat de problemele de sănătate publică și nu de cele de sănătate animală, vezi fig. 2.

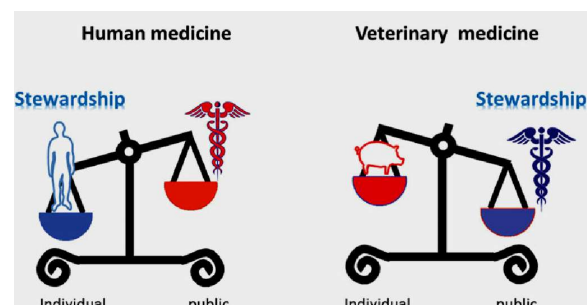


Figura 2. Balanța dintre medicina veterinară și umană

a. Modalități de răspândire, instalare a rezistenței și urmările acesteia

Utilizarea iresponsabilă a antibioticelor la animalele de fermă, a dezvoltat rezistența la animale sau la persoane care consumă carne și subproduse. Antibioerezistența a apărut mai ales prin folosirea antibioticelor ca biostimulatori, în conservarea alimentelor de natura animală sau cel mai des prin administrarea antibioticelor nerațional, fără rețetă și antibiogramă. Rezistența este un fenomen ce se răspândește la nivel mondial, conform CDC (fig. 3).

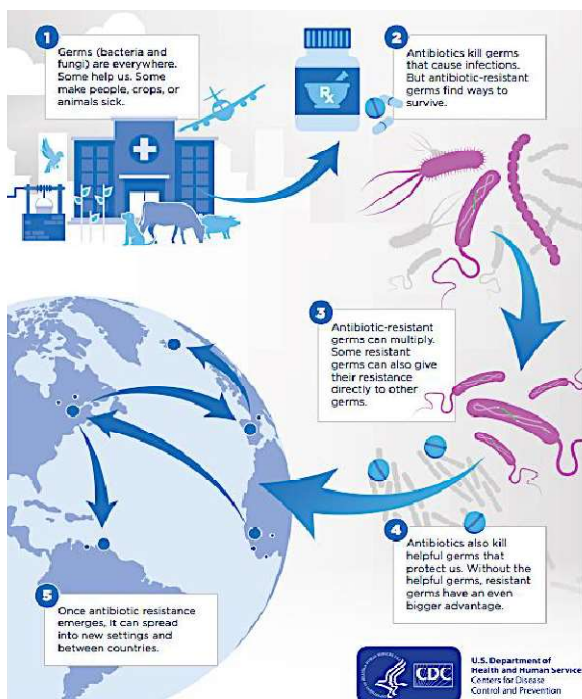


Figura 3. Răspândirea RAM la nivel mondial (16)

Riscurile RAM sunt reprezentate de faptul că infecțiile sau rănilor simple, precum și diferite proceduri medicale de rutină se bazează pe tratamentul cu antibiotice, astfel speranța de viață poate să scadă (vezi fig. 4).

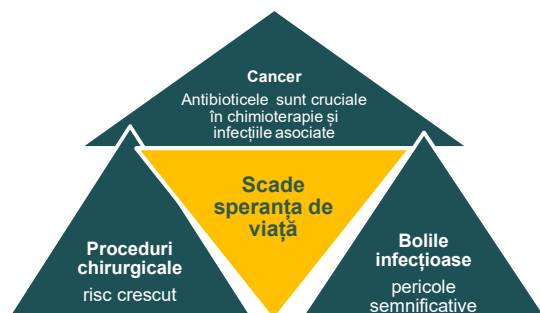


Figura 4. Riscurile RAM

Condițiile care determină apariția rezistenței la antibiotice sunt:

- prin selecție, genomul bacterian a devenit de aprox.1000 de ori mai mic decât genomul animal / uman. Acest fapt este datorat „raționalizării genomului”,
- între bacterii există concurență acerbă pentru resurse,
- pentru a se menține și reproduce, genomul bacterian are nevoie de energie și resurse. Un genom mare, necesită mai multă energie pentru a fi păstrat în funcțiune și duplicare.

Cel mai adesea, procesul de selecție (vezi fig. 5) este exacerbat de factorii umani prin:

- utilizarea inadecvată a medicamentelor în medicina umană și veterinară.
- condițiile de igienă deficitară
- practicile medicale curente greșite
- erorile în cadrul lanțului alimentar

Tehnicile de screening genomic, nu au reușit încă să livreze promisiunea lor de „revoluție” în descoperirea de noi antibiotice, acest lucru a condus în timp la apariția de „superbugs”, adică bacterii rezistente la majoritatea antibioticelor utilizate.

Exemple clasice: *S. aureus* rezistent la metilicilină (MRSA), *M. tuberculosis* super-rezistent la antibiotice.

Apariția rezistenței la fluoroquinolone, după infecții banale cu *Campylobacter* și *E. coli* la oameni este clar urmarea utilizării acestora în furajele animalelor, cu transmiterea bacteriilor rezistente la om prin intermediul cărnii și produselor animale.

Cele mai multe rapoarte se referă la tendința de creștere a utilizării substanțelor antimicrobiene folosite în doze sub-terapeutice la animalele de rentă și păsări.

Atât dovezile moleculare cât și cele epidemiologice indică faptul că prevalența rezistenței la antibiotice printre oameni a fost declanșată prin introducerea enrofloxacinii în furajarea păsărilor, fapt care a determinat FDA în 2011 să interzică utilizarea acestui medicament la păsări.

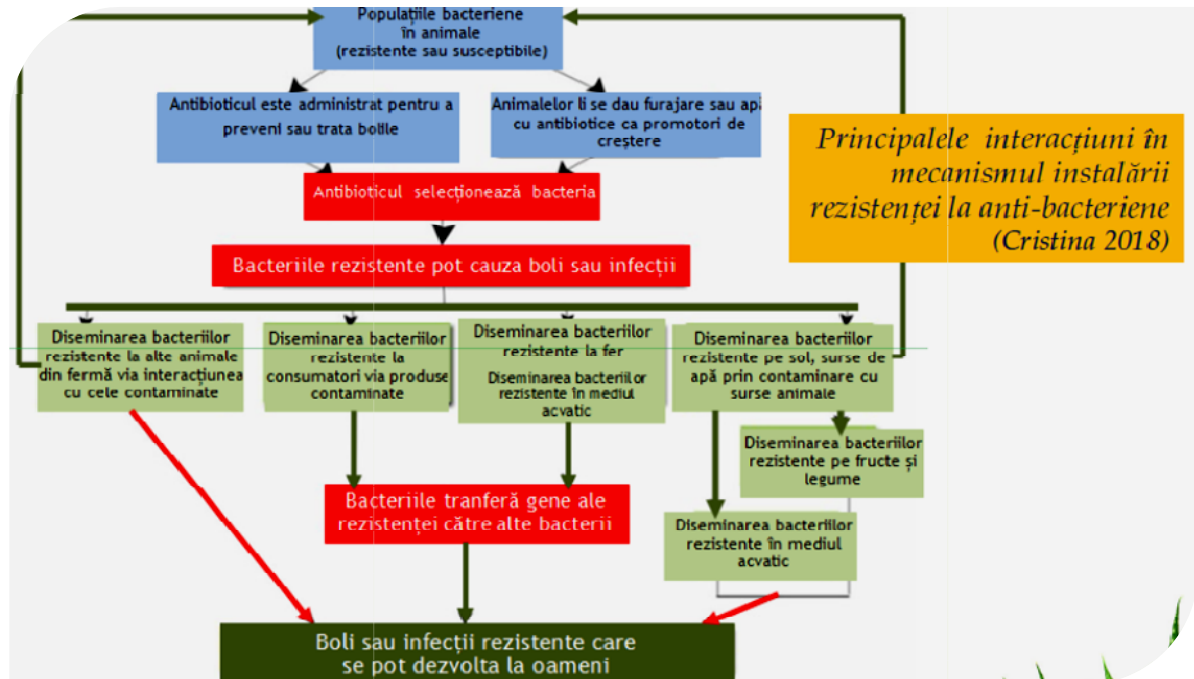


Figura 5. Principalele interacțiuni în mecanismul instalării rezistenței

În România principalele cauze ce favorizează apariția fenomenelor de rezistență la medicamente sunt:

- sub-dozarea/dozarea inadecvată a substanțelor active
- tratamentul bolilor virale la animale cu antibiotice
- administrarea la orice tratament a antibioticelor / antiparazitarelor cu spectru larg, în timp ce medicamentele cu spectru îngust ar fi suficiente.

Prescrierea excesivă a antibioticelor nu este singura sursă de antibiotice care poluează mediul. Încă din anii 70, antibioticele puteau fi găsite în carnea bovinelor, porcilor și păsărilor, aceleași antibiotice fiind identificate mai apoi în sistemele de apă municipale și freatice sau în sol, cu urmările sale dramatice.

Antibioticele administrate animalelor nu sunt complet absorbite de către acestea.

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

Antibioticele administrate animalelor ajung adesea în sol și apă prin deșeurile medicale și

medicamentele eliminate necorespunzător sau prin praful provenit din unitățile de creștere industrială (vezi fig. 6).

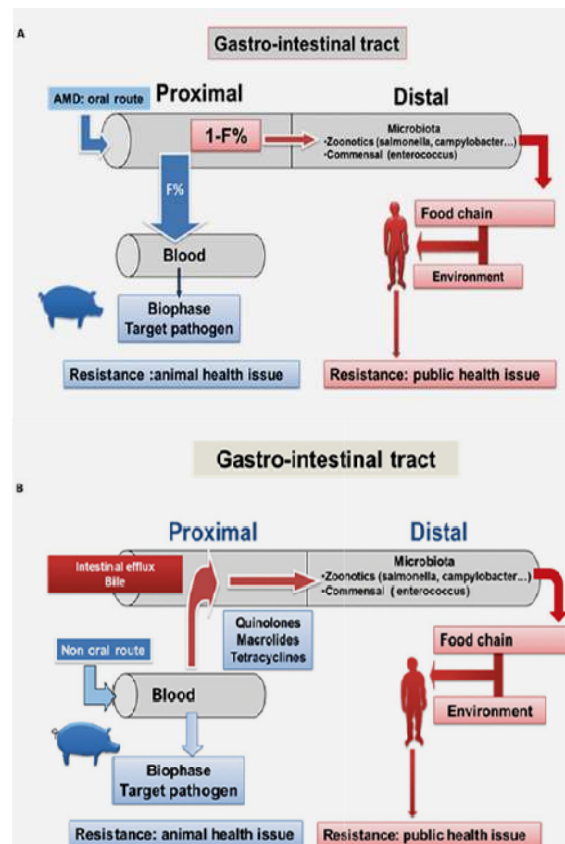


Figura 6. Impactul administrării antibioticelor pe cale orală (A) și sistemică (B)(2)

După administrarea orală de antibiotice) microbiota intestinală distală (ce cuprinde agenți patogeni zoonotici și flora comensală) va fi expusă la fracția de medicament neabsorbit în segmentul proximal digestiv, ceea ce crește presiunea selectivă locală și astfel crește densitatea bacteriilor și deci, frecvența genelor rezistenței.

Aceste organisme și genele pot ajunge la om, prin mai multe căi și, în cele din urmă, vor avea acces la microbiota TGI (tract gastro-intestinal) uman prin calea metabolică principală, lanțul alimentar.

După administrarea sistemică (vezi fig. 6) majoritatea medicamentelor a.u.v. sunt eliminate, și ajung în TGI, fie prin secreția biliară, fie prin clearance-ul intestinal, astfel apar concentrații ale farmaconului capabile să selecteze organisme rezistente.

În plus, impactul asupra microbiotei TGI animal al antibioticelor nu se limitează doar la fracția aerobă - aprox. 1-2% din totalul microbiotei; (de obicei *Escherichia coli* și *E. faeciens* - considerate bacterii santinelă) - poate, de asemenea, genera un impact negativ asupra populației anaerobe (care reprezintă o secvență mult mai mare).

Bacteriile rezistente și genele rezistenței sunt eliberate în mediu (vezi fig.7) prin intermediul excreției fecale.

Antibioticele care au fost identificate în apele de suprafață au inclus adesea: macrolide, sulfamide, tetraciline, cloramfenicoli, clortetracilina, sulfametazina, lincomicina, trimetoprimul, sulfadimetoxinul, sulfametazin

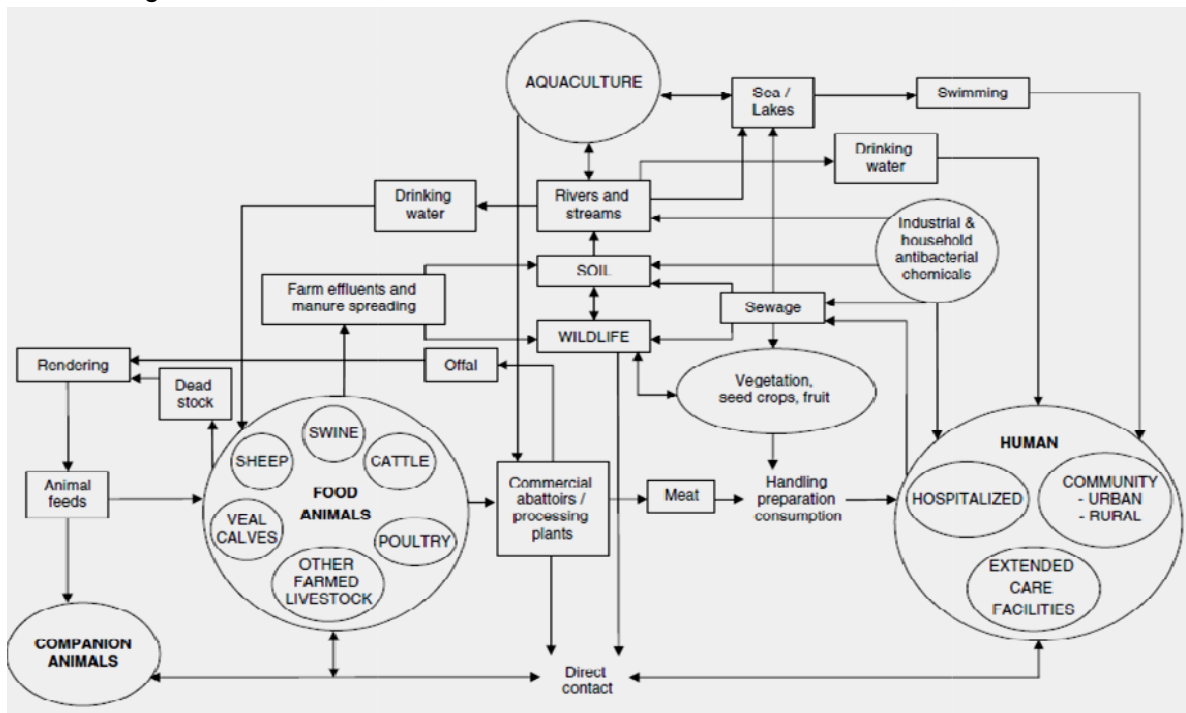


Figura 7. Mecanismul transmiterii rezistenței în natură

Rezistența la antifungice a devenit o preocupare semnificativă pentru medicina veterinară, rezistența la medicamentele antifungice disponibile în prezent se poate dezvolta secundar mecanismelor dobândite ca urmare a expunerii la aceste medicamente (11).

Rezistența la medicamentele antifungice poate fi intrinsecă sau dobândită.

Rezistența intrinsecă este o caracteristică moștenită a unei specii sau tulpini. În schimb, rezistența dobândită apare atunci când un izolat, sensibil anterior dezvoltă un fenotip rezistent ca urmare a unui tratament prelungit cu antifungice (9).

Mecanismul asociat cu rezistența dobândită depinde de modul de acțiune al clasei de medicamente antifungice și include absorbția redusă de medicamente, eliminarea

de medicamente prin pompe de eflux sau afinitatea redusă a enzimelor țintă.

Spre deosebire de celulele bacteriene, celulele fungice intacte nu preiau ușor ADN-ul exogen. Drept urmare, rezistența la medicamente transferabile nu a fost descrisă printre taxonii fungici, iar răspândirea rezistenței a fost considerabil mai lentă decât cea observată la bacterii.

Prevenirea apariției și răspândirii ciupercilor rezistente depinde de utilizarea tratamentului local mai degrabă decât cel sistemic (reducând astfel expunerea generală a florei fungice a animalului la agenții antifungici). În plus, terapia antifungică combinată este o strategie bine recunoscută pentru prevenirea apariției rezistenței la flucitozină (8).

Rezistența la medicamente antifungice poate apărea prin diferite mecanisme ale agenților fungici.

Acestea pot include: mutații în cadrul genei care codifică enzima țintă care duce la modificări în secvența de aminoacizi, exprimarea crescută a enzimei țintă prin transcrierea exagerată a genei pe care o codifică, concentrații reduse ale antifungicelor din celulele fungice din cauza efluxului medicamentos, modificări ale căii de biosinteză, ceea ce duce la scădere în producerea țintei medicamentelor antifungice (12).

Câinii sunt considerați a fi unele dintre potențialele rezervoare ale rezistenței antimicrobiene care poate fi transmisă la om prin contact direct sau indirect. Numărul de persoane care trăiesc cu animale de companie, în special câini, a crescut în întreaga lume în ultimele decenii (13).

Deși prevalența rezistenței antifungice nu este la nivelurile observate pentru unele bacterii împotriva diferitelor antibiotice, opțiunile de tratament pentru infecțiile fungice invazive sunt limitate. În mod clar, sunt necesare noi strategii de tratament pentru a rezolva această problemă, pe lângă depășirea efectelor toxice / efectelor adverse și a interacțiunilor medicamentoase asociate cu antifungicele disponibile în prezent, care pot limita eficacitatea terapiei (14).

Arsenalul nostru limitat de antifungice este în continuare amenințat de dezvoltarea tulpinilor de ciuperci rezistente la multe medicamente și apariția agenților patogeni rezistenți intrinsec (15).

În general, nivelul de rezistență la agenții antifungici este relativ scăzut, dar rămâne o provocare serioasă a managementului clinic pentru pacienții individuali, cu risc ridicat și cei cu micoze persistente (10).

b. Studiarea eficacității antimicrobiene

Pentru determinarea eficacității substanțelor antimicrobiene se cunosc mai multe teste, considerate ca fiind standard în multe țări, care permit analizarea antibioticelor.

Cele mai importante testări sunt:

1. Testele biologice

Testele biologice permit o stabilire precisă și sensibilă a antibioticelor.

Metoda difuzimetrică este considerată o tehnică uzuală pentru β -lactamine, unde limitele detectabile sunt de ordinul ng./ml. (10^{-9} ng/ml).

Marea majoritate a acestor teste depind de utilizarea unui mediu cu agar, înșămânțat cu o tulpină bacteriană selecționată, peste care sunt plasate diluții diferite ale antibioticului în testare.

Plăcile sunt incubate la 37°C , după ce se face citirea, în funcție de zona de liză determinată de către antibioticul testat, raportată adesea la un antibiotic standard.

2. Testele fizico-chimice

Metodele cele mai folosite pentru testarea antimicrobiene sunt: spectrofotometria, spectrofotofluometria și mai recent cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC).

Aceste teste sunt în general mai puțin sensibile, comparativ cu testele biologice, deoarece sunt tributare în mare măsură de metodele de preparare și purificare a probelor.

Dintre acestea HPLC este cea mai versatilă și cu perspective de utilizare.

3. Testele *in vitro*

Datorită faptului că toate antibioticele au limitări cu privire la activitatea asupra bacteriilor pe care le afectează (fie datorită activității lor intrinsece, fie datorită rezistenței acumulate) cel mai adesea este de dorit de a se determina sensibilitatea unei tulpini izolate de la animale bolnave, în ideea de a selecta conduita terapeutică cea mai corectă.

Metoda discului sau Kirby Bauer

Este mai degrabă un test calitativ, care se bazează pe aplicarea unor discuri din hârtie impregnate cu antibiotic (vezi fig. 8), plasate pe plăcuțe Petri inoculate.

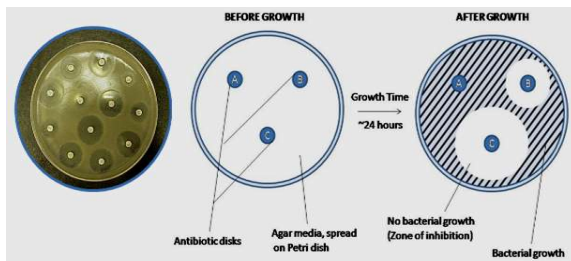


Figura 8. Antibiogramă – Metoda Kirby Bauer (17)

Dezavantajul metodei este necesitatea izolării de culturi pure pentru testare, ceea ce înseamnă o amânare cu 24-36 ore a rezultatelor. În condiții de teren acest timp este deci prea lung, tardiv pentru animalele care au nevoie de tratamentul optim. Rezolvarea (frecvent aleasă de practicienii) constă în începerea tratamentelor cu antibiotice cu spectru larg, fără a mai aștepta rezultatele. Testarea difuziei pe disc (Kirby-Bauer) pentru antifungice se realizează pe plăcuțe Petri cu mediul de cultură Mueller-Hinton, de 4 mm grosime, folosind discuri de hârtie impregnate cu antifungice (CLSI, 2006a, b).

Metodele bazate pe diluții

Testarea sensibilității prin diluții se poate face folosind bulion sau agar și furnizează date cantitative (MIC).

Se testează diluții duble de antimicrobiene (0,12 μg/ml, 0,25 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml). Întotdeauna în testare se include un control fără substanțe antimicrobiene (8).

Concentrația minim inhibantă (MIC)

Este un test care dă măsura cantitativă a unei populații bacteriene la un anumit antibiotic. Această metodă este considerată cea mai uzuală metodă standard de analiză a eficienței unui antibiotic.

MIC se obține prin creșterea unor microorganisme în concentrații succesive de antibiotic, astfel cele mai mici concentrații care vor opri creșterea bacteriilor vor fi considerate MIC, (vezi fig. 9).

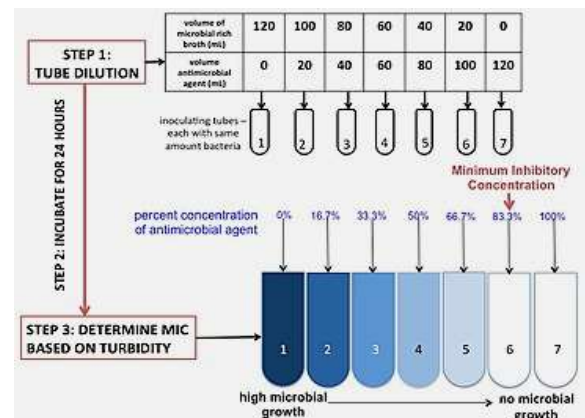


Figura 9. Metoda diluțiilor seriate și determinarea MIC pe baza turbidității

Cifra obținută nu va fi considerată absolută pentru că e afectată de multe necunoscute (ex. numărul microorganismelor inoculate la începerea testării (care trebuie să fie în jur de 10^5 bacterii/ml).

Concentrația bactericidă minimă (MBC)

În acest caz sunt utilizate concentrații mai mari, ce mai apoi vor fi adăugate la o nouă serie de antibiotic. După incubare tuburile sunt reînsămânțate în medii potivite și comparate cu o subkultură a tuburilor martor dinainte de incubare, putându-se obține trei variante:

- creștere similară cu tuburile martor = acțiune bacteriostatică
- creștere dispartă = acțiune bactericidă incompletă
- mediu steril (nici o creștere) = acțiune bactericidă

Cele mai mici concentrații care vor da acest rezultat vor fi considerate MBC pentru antibioticul studiat, împotriva unei anumite populații bacteriene.

Concentrația minimă de antibiotic (MAC)

Studiile au arătat că antibioticele *in vivo* pot exercita activitate terapeutică la concentrații mult mai mici decât MIC, și, de aceea, interpretări ca, de exemplu, concentrațiile serice, nu pot fi luate ad literam pentru a exprima eficacitatea unui antibiotic.

MAC a fost definit ca fiind concentrația antibioticului ce va reduce creșterea unui organism *in vitro* cu un factor de 10 (ex. 1 log.). Valoarea MAC trebuie să fie o pătrime sau o zecime din valoarea MIC, fiind dependentă de antibiotic și organism.

Existența efectelor benefice la concentrațiile mici explica de ce doze relativ mici, sub-terapeutice pot fi neașteptat de eficiente clinic.

Kituri pentru identificarea și determinarea rezistenței la antifungice

Exemple de kituri pentru identificarea și determinarea rezistenței la antifungice sunt **Candifast**, **Fungifast** și **Fungitest** (3).

Kiturile **Candifast** și **Fungifast** combină identificarea și testarea rezistenței la antifungice a principalelor levuri patogene.

Testele se efectuează în galerii a câte 20 de godeuri, gata de utilizare, care se însămânțează din același inocul (3, 4).

Trusa Candifast (vezi Fig. 10) permite identificarea principalelor levuri patogene precum și testarea rezistenței acestora la diferite antifungice utilizate în tratamentul micozelor superficiale.



Figura 10. Kit Candifast (4)

Kit-ul de identificare se bazează pe teste de fermentare și pe determinarea prezenței ureazei. Acest test poate identifica 8 specii de

Candida și poate preciza dacă tulpina testată face parte din genurile *Trichosporon*, *Geotrichum* sau *Rodothorula*, dar fără a putea preciza genul sau specia (4).

Fungifast (vezi fig. 11) permite identificarea următoarelor levuri: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* (4).



Figura 11. Kit Fungifast (4)

Citirea rezultatelor se efectuează cu ajutorul schemei de interpretare colorată, inclusă în trusă, iar pentru interpretare sunt disponibile un tabel de identificare și un sistem de codificare [4].

Fungi-Test este un kit care testează sensibilitatea la următoarele antifungice: amfotericina B, ketoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol și flucitozină.

Testul poate preciza dacă tulpina este sensibilă, intermediar sensibilă sau rezistentă prin testarea sensibilității la două concentrații diferite pt. fiecare antifungic (5).



Figura 12. Kit Fungitest (18)

Etest, (cunoscut înainte ca Epsilometer test) fabricat de bioMérieux, este un kit de diagnostic *in vitro* manual, utilizat pentru a determina MIC (concentrația minimă inhibitorie) și dacă o tulpină bacteriană sau

fungică este sau nu este susceptibilă la acțiunea unui antimicrobian specific (7).

Ettest este un strip inert și non-poros din plastic, cu un gradient de antimicrobian predefinit, care acoperă un interval de concentrație continuă, pentru determinarea valorilor MIC a unei game largi de agenți antimicrobieni, în $\mu\text{g} / \text{ml}$ (7) (vezi fig. 13).

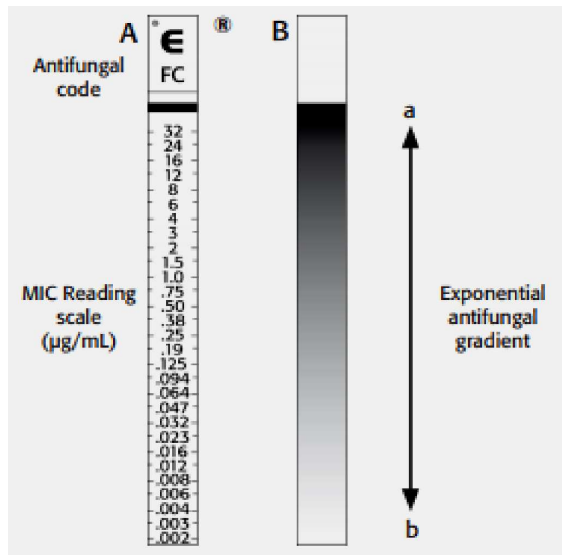


Figura 13. Strip E-test

A-scala de citire a MIC, B- Gradientul agentului antifungic cu concentrație maximă (a) și minimă (b)

O parte a stripului (A) cuprinde scala de citire a MIC în $\mu\text{g} / \text{ml}$ și un cod de două sau trei litere pentru a desemna identitatea agentului antifungic.

Un gradient predefinit, exponențial al agentului antifungic, uscat și stabilizat, este pe cealaltă parte a benzii (B), cu concentrația maximă la a și minimumul la b

Gradientul acoperă un interval de concentrație continuă pe 15 diluții de două ori ale unei metode MIC convenționale (7).

Tehnicile moleculare

Tehnicile moleculare oferă o evaluare mai rapidă și mai precisă a rezistenței primare și secundare decât metodele clasice.

Aceste aplicații înlocuiesc treptat sau completează testele bazate pe culturi, testele biochimice și imunologice pentru detectarea unei game largi de microorganisme.

Pentru animale și oameni genele care codifică rezistența la antimicrobiene au fost

detectate prin tehnici de biologie moleculară, respectiv prin: Polimerase Chain Reaction (PCR) și Real-time PCR (9, 10).

Bibliografie

- https://www.eca.europa.eu/lists/ecadocuments/sr19_21/sr_antimicrobial_resistance_ro.pdf
- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01196/full>
- Costache, C., Colosi, I., Junie M.** Specii de Candida izolate din infectiile micotice, FMV Cluj-Napoca.
- <https://clinilab.ro/microbiologie/diagnostic-micologic>
- Iulian, O.** 2015, Abordări contemporane în sensibilitatea și rezistența antifungică, Buletinul AȘM. Științele vieții. Nr. 3(327).
- <https://www.bio-rad.com/en-ch/sku/60780-fungitest-kit?ID=60780>
- <https://www.biomerieuxdiagnostics.com/etes-tr-antimicrobial-resistance-detection-ard>
- Giguere S., Prescott J.F., Dowling P.** 2013, Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition, Ed. Wiley Blackwell
- Cristina, R.T.** 2006, Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. SOLNESS, Timișoara
- Perlin S. David,** 2014, Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? Curr Opin Infect Dis. 22(6): 568–573.
- Wiederhold, N.P.,** 2017, Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, *Infect Drug Resist.*, Aug 29; 10:249-259.
- Syedmojtaba S., Bosco S.M, Hoog S., Ebel F., Elad D., Gomes R., Jacobsen I., Jensen H., Martel A., Mignon B., Pasmans F., Piecková E., Rodrigues A.M., Singh K., Vicente V., Wibbelt G., Wiederhold N., Guillot J.** 2018, Fungal infections in animals: a patchwork of different situations, *Med Mycol.*; 56(Suppl 1): S165–S187
- Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A.** 2019, Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis, *Epidemiology & Infection*, vol.4, Cambridge core.
- Wiederhold, N.P.** 2017, Antifungal resistance: current trends and future

- strategies to combat, *Infect Drug Resist.*, Aug 29; 10:249-259.
15. **Revie, N., Iyer, K., Robbins, N., Cowen, L.** 2018, Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact, *Curr Opin Microbiol.* ;45:70-76.
 16. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistancehappens.html>
 17. https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test
 18. <https://www.diagnostics-bio-rad.com/wp-content/uploads/2017/01/Fungitest.pdf>
- Nota:** alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:
- Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018).** Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar/ Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49. Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și <http://www.asas.ro/wcmqgs/sectii/medicinaveterinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezidenta%20la%20medicament.pdf>
- Cristina T. Romeo.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
- Cristina T. Romeo (2010).** Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>
- Cristina T. Romeo (2012).** Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>
- Cristina RT (2006).** Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.
- Cristina RT, Chiurciu V (2010).** Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timișoara
- Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT (2015).** The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320
- ECDC (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 –** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- EPRUMA 2018 -** Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics%20EPRUMA_FINAL%20.pdf
- Lista O.I.E** a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015.** Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/doc

[ument_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf](http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/750.pdf)

World Health Organisation (WHO) (2015). Data Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la: <http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>

World Health Organisation (WHO) (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2001). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10

World Health Organization Study Group (WHO) (2002). Future trends in veterinary public health. World Health Organ Tech Rep Ser., 907:1-85. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CD_S_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G. 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M. 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36

Riviere, J.E., Papich, M.G., 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwell

Mareș, M., Năstasă, V., Moraru, R. 2013, Terapia antifungică în medicina veterinară, Ed. PIM, Iași