

RST – Raport științific și tehnic *in extenso*

Etapa 2. Recoltarea probelor și analiza bacteriologică și moleculară a acestora

Perioada de raportare: 29/12/2018 — 27/12/2019

Titlul proiectului: ANTIMICROBIAL RESISTANCE MANURE INTERVENTION STRATEGIES / STRATEGII DE INTERVENȚIE ASUPRA GUNOIULUI DE GRAJD CU PRIVIRE LA REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE

Acronimul proiectului: ARMIS

Cod proiect: COFUND-JPI-EC-AMR-ARMIS Nr. contract: 40/2018

Durata: 35 luni (01.06.2018 – 30.04.2021)

Director proiect: Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman

Coordonator: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman

Partener 1: University of Western Ontario Department of Biology, London, Canada: Dr. Ed Topp

Partener 2: University of Guelph, Department of Pathobiology, Guelph, Canada: Dr. Patrick Boerlin

Partener 3: Research Institute of the University of Bucharest, Faculty of Biology: Prof. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc

Partener 4: Justus-Liebig University, Institute for Applied Microbiology Heinrich-BuffRing, Gießen Germany: Prof. Dr. Dr-Ing. P. Kämpfer

Partener 5: Wageningen Livestock Research, Wageningen Research, The Netherlands: Ing. Paul Hoeksma

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| 1. Obiective/activități prevăzute | 1 |
| 2. Rezumatul etapei | 2 |
| 3. Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor | 3 |
| 4. Diseminarea rezultatelor | 15 |
| 5. Bibliografie | 16 |

1. OBIECTIVE/ACTIVITĂȚI PREVĂZUTE

- Activitatea 2.1. Recoltarea probelor de gunoi de grajd/materii fecale/sol de la fermele de animale și izolarea de bacterii rezistente la antibiotice
- Activitatea 2.2. Identificarea bacteriilor rezistente izolate
- Activitatea 2.3. Determinarea profilului de rezistență la antibiotice a tulpinilor izolate
- Activitatea 2.4. Extracția ADN din probele biologice recoltate și realizarea reacțiilor qPCR pentru gene reprezentative selectate
- Activitatea 2.5. Managementul proiectului

2. REZUMATUL ETAPEI

În cadrul acestei etape a proiectului ARMIS s-a finalizat selectarea fermelor participante la studiu. Au fost selectate patru ferme de animale, respectiv două exploatații de suine în sistem integrat, cu o capacitate totală de 10.000 de capete, cu sectoare de reproducție, creștere și îngrijire în aceeași locație și două de bovine, destinate producției de lapte, cu capacitate de cazare de peste 300, respectiv 500 de animale, întreținerea realizându-se în varianta tehnologică mixtă, respectiv legată și liberă. De asemenea, au continuat studiile din etapa precedentă privind optimizarea protocoalelor de izolare a tulpinilor de enterococi rezistenți la vancomicină (VRE), *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), *E. coli* producătoare de beta-lactamaze de spectru extins (ESBL) și *Enterobacteriaceae* producătoare de carbapenemaze (CRE), prin două metode bazate pe cultivare: metoda directă și metoda cultivării prin îmbogățire. Tulpinile izolate au fost identificate cu ajutorul metodelor automate Maldi-Tof și Vitek, iar rezistența la antibiotice a fost confirmată prin Vitek și PCR. După optimizarea protocoalelor, a demarat, de asemenea, recoltarea și analiza probelor de gunoi de grajd, de la o fermă de porcine și una de bovine, fiecare fermă având câte 2 bazine aflate în faze diferite – un bazin în etapa finală, de golire și împrăștiere pe teren a compostului și un bazin în faza de umplere. Pe lângă probele de gunoi de grajd, prelevate din cisterna cu care se împrăștie compostul pe miriște, și respectiv, din conducta de alimentare, au fost colectate o serie de date privind furajarea și tratamentele administrate animalelor, metodologia de compostare și împăștiere a compostului. Analiza preliminară a probelor recoltate a evidențiat prezența majorității fenotipurilor de rezistență, cu excepția CRE, în probele prelevate de la ambele ferme, de suine și de bovine, atât la începutul, cât și finalul procedurii de compostare. Din probele de gunoi de grajd recoltate s-a extras ADN și s-a investigat prin Real-time PCR abundența genelor de rezistență. Toate cele patru tipuri de probe luate în studiu au prezentat niveluri similare de expresie a ADNr 16S și a genei de rezistență bla_{oxa48}.

În ceea ce privește managementul proiectului, la fiecare 6 săptămâni au avut loc teleconferințe la care au participat reprezentanți ai țărilor membre ale consorțiului, în cadrul cărora au fost agreate procedurile de lucru standardizate utilizate pentru izolarea și confirmarea tulpinilor rezistente, a fost agreată varianta finală a logo-ului proiectului realizat de partenerul român și a fost stabilită structura website-ului proiectului. Rezultatele preliminare obținute au fost publicate într-o lucrare indexată BDI, prezentate la o conferință internațională și în cadrul a trei lucrări de finalizare a studiilor (o teză de doctorat, o teză de disertație și o teză de licență).

Activitățile propuse pentru aceasta etapă a proiectului au fost îndeplinite în totalitate.

3. DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ

Activitatea 2.1. Recoltarea probelor de gunoi de grajd/materii fecale/sol de la fermele de animale și izolarea de bacterii rezistente la antibiotice

3.1.1. Selecția fermelor participante la studiu și recoltarea de probe de gunoi de grajd

Pentru **selecția fermelor de porcine** s-a luat în considerare situația epidemiologică cu privire la Pesta Porcină Africană (PPA), în România înregistrându-se un număr mare de focare de boală, în peste 25 de județe, ceea ce a determinat luarea unor măsuri drastice privind condițiile de biosecuritate din ferme, sacrificarea unui număr mare de animale și restricții de circulație. Astfel, au fost **selectate două ferme de suine din centrul țării, regiune ce nu a înregistrat nici un focar de PPA**. Ambele ferme, fiecare cu o capacitate totală de 10.000 de capete, sunt exploatații de suine în sistem integrat, cu sectoare de reproducție, creștere și îngrășare în aceeași locație.

La sfârșitul lunii octombrie s-a efectuat o primă prelevare de probe de la una dintre fermele de porcine selectate și au fost colectate date din care rezultă că:

- Se efectuează tratamente curente la animalele cu diverse afecțiuni;
- Se realizează tratamente profilactice antiparazitare cu ivermectine (la scroafe și tineret de două ori pe an) și cu antibiotice (ex. colistin în furaj până la 4 săptămâni, amoxiciclin până la 25 kg) și în furajul granulat prestarter timp de 3 – 4 zile în preajma înțărării, la tineretul suin;
- Se efectuează analize conform Programului Strategic, respectiv pentru PPA săptămânal pe cadavre din fiecare hală și în caz de suspiciune supraveghere pasivă pentru PPA și PPC (pesta porcină clasică) din cadavre cu semne clinice aferente celor două boli; supravegherea bacteriologică pe cadavre și coproparazitologică se efectuează la cerere;
- Furajarea se realizează cu furaje lichide pe suport de zer;
- Împrăștierea compostului se realizează pe o suprafață de cca. 800 hectare de teren.

Exploatația deține două bazine de suprafață, în care gunoiul de grajd împreună cu purinul sunt depozitate timp de aproximativ 4 - 6 luni cu amestecare periodică la 2 – 3 săptămâni. După cele 4 – 6 luni compostul amestecat prin barbotare se împrăștie, cu cisterna, pe miriștile din proprietatea societății, unde este înglobat în sol prin ararea terenului imediat (în aprox. 1 – 3 zile). Bazinele au următoarele caracteristici:

- un bazin din inox (1), tubular, cu o capacitate de 2.700 m³,
- un bazin descoperit tip lagună (2), căptușit cu folie, cu o capacitate de 4.000 m³, de formă conică cu partea cea mai adâncă în mijloc, diametrul de 30-35 m, iar înălțimea de aprox. 2,5-2,8 m, cu sistem de amestecare situat central, alimentarea acestuia realizându-se aproximativ săptămânal și la încheierea unei etape tehnologice (ex. la transferul din maternitate).

Bazinele se umplu pe parcursul a 2-3-4 luni, apoi se stochează conținutul 2-3 luni, fără a mai adăuga gunoi de grajd. Dezinfecția halelor se face cu soluții cu acțiune împotriva virusurilor, bacteriilor, fungilor și mușcăturilor, iar apa reziduală ajunge tot în bazinele de colectare a purinului și gunoiului de grajd.

La prelevarea probelor, bazinele se aflau în etape tehnologice diferite, respectiv:

- bazinul 1 – etapă finală – la golire și împrăștierea pe teren
- bazinul 2 - în faza de umplere (colectarea a început în luna septembrie).

Au fost prelevate două probe, fiecare având aproximativ 500 g, astfel:

- proba nr. 1 (la golirea bazinului 1) a fost prelevată din cisterna cu care se împrăștia pe miriște compostul rezultat,
- proba nr. 2 a fost recoltată la umplerea bazinului 2, din conducta care deversează în lagună.

În vederea prelevării probelor de **compost din ferme de bovine**, au fost selectate **două unități din zona centrală a țării, aflate în diferite etape tehnologice**. Capacitatea de cazare în cele două ferme este de peste 300, respectiv 500 de animale. Exploatațiile dețin vaci destinate producției de lapte, întreținerea animalelor realizându-se în varianta tehnologică mixtă, respectiv legată și liberă.

La finele lunii octombrie s-a efectuat o primă prelevare de probe de la una dintre fermele de bovine selectate. Din datele colectate reiese că:

- Se efectuează tratamente curente doar la animalele cu diverse afecțiuni;
- Nu se efectuează tratamente cu antibiotice profilactice sau metafilactice;
- Se efectuează tratamente antiparazitare primăvara și toamna cu Ivermectine, Albendazol sau Dovistom, în funcție de perioada de lactație;
- Se efectuează analize conform Programului Strategic, respectiv pentru Bruceloză bovină și LEB (leucoză enzootică bovină) în aprilie, tuberculinări în octombrie;
- Furajarea se realizează cu fân, cereale sau prin pășunare.

Exploatația deține două bazine de suprafață. În aceste bazine gunoiul împreună cu purinul sunt depozitate timp de aproximativ 4 - 7 luni cu amestecare o dată/săptămână. După cele 4 - 7 luni compostul amestecat se împrăștie pe miriștile din proprietatea societății, unde este înglobat în sol prin ararea terenului imediat (în 1-2 zile).

Cele două bazine sunt confecționate din tablă, tubulare, căptușite cu folie, cu o capacitate de 1000 m³/bazin, înălțimea = 4m, diametrul = 25m.

La prelevarea probelor, similar fermei de suine, bazinul din tabla nr. 1 se afla etapa finală de golire și împrăștierea pe teren, iar bazinul din tabla nr. 2 - în faza de umplere. Au fost prelevate două probe de aprox. 500g/probă, respectiv proba 1 (la golirea bazinului 1) din cisterna cu care se împrăștie pe miriște compostul și proba 2 a fost recoltată la umplerea bazinului nr. 2, din conducta de alimentare.

Probele au fost transportate în condiții de refrigerare și recepționate pentru investigații de laborator în ziua prelevării.

3.1.2. Optimizarea protocolului de analiză pentru detectarea și determinarea cantitativă a unor fenotipuri bacteriene de rezistență la antibiotice în probe de gunoi de grajd

În vederea optimizării protoalelor de detectare a unor bacterii de rezistente la antibiotice **au fost analizate un număr de 6 probe de compost / gunoi de grajd din ferme (bovine și ovine)**, codificate astfel: CV1, CV2, CV3, CO4, CV5 și CV6.

Fenotipurile de rezistență analizate în probele de gunoi de grajd au fost reprezentate de: enterococi rezistenți la vancomicină (**VRE**), *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (**MRSA**), *E. coli* producătoare de beta-lactamaze de spectru extins (**ESBL**) și *Enterobacteriaceae* producătoare de carbapenemaze (**CRE**).

Probele de gunoi de grajd au fost analizate prin două metode bazate pe cultivare: metoda directă și metoda cultivării prin îmbogățire.

Probele de gunoi de grajd au fost conservate la $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Pentru fiecare probă au fost analizate următoarele cantități (subprobe): 10g, 1g și 0.1g.

Metoda cultivării directe

Pentru fiecare probă analizată, subprobele de 10 g au fost puse în suspensie în tampon fosfat salin, omogenizate prin agitare (250 rpm), timp de o oră. După incubare, un volum de 100 μl supernatant a fost inoculat direct cu ajutorul unei baghete Drigalski, sterile, pe fiecare mediu de cultivare utilizat în analiză (**Tabelul 1**).

Tabelul 1. Optimizarea protocolului de detectare a unor bacterii rezistente la antibiotice în probe de gunoi de grajd prin metode de cultivare directă.

| Organism analizat | Mediu de cultivare utilizat pentru inoculare directă a probelor de gunoi de grajd | Condiții de cultivare |
|---------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> | TBX (<i>Tryptone Bile Glucuronic</i>) agar (Oxoid) | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp 4 h și apoi 24 h de incubare la $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. |
| <i>E. coli</i> ESBL | TBX agar suplimentat cu 2 mg/L cefotaxim, CLED agar suplimentat cu 2mg/L cefotaxim MacConkey agar suplimentat cu 2mg/L cefotaxim | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp 4 h și apoi 24 h de incubare la $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. |
| CRE | ChromID Carba (Biomerieux) | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp 4 h și apoi 24 h de incubare la $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. |
| MRSA | ChromID MRSA | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp 24 h |
| VRE | ChromIDVRE | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp 24 h |

Metoda de cultivare bazată pe îmbogățire

Fiecare din cele trei subprobe, de 10 g, 1 g și 0.1 g au fost inoculate și omogenizate în 90 de mL, 9 mL și 0.9 mL de mediu de îmbogățire lichid pentru detectarea *E. coli* și a tulpinilor rezistente: ESBL, CRE, VRE și MRSA (**Tabelul 2**).

Tabelul 2. Optimizarea protocolului de detectare a unor bacterii rezistente la antibiotice în probe de gunoi de grajd prin metode de cultivare bazată pe îmbogățire.

| Microorganism analizat | Mediu de îmbogățire lichid | Condiții de cultivare |
|------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> ESBL | EC lichid suplimentat cu 2 mg/L cefotaxim | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 h, cu agitare (250 rpm) |
| CRE | Apă peptonată | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 h, cu agitare (250 rpm) |
| VRE | Bulion azidă de sodium suplimentat cu 6 mg/L vancomicină | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 h fără agitare |
| MRSA | Prima etapă: Muller Hinton lichid cu 6% sare | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 h cu agitare |
| | A doua etapă : cultivare 1 ml cultură de 24 de ore în 9 mL CASO lichid suplimentat cu cefoxitin 3.5 mg/L și aztreonam 50 mg/L | $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 18-24 h fără agitare |

După incubare și agitare ușoară, din cultura obținută peste noapte s-a inoculat pe mediile selective corespunzătoare fenotipurilor de rezistență analizate un volum de 10 μl cu ajutorul unei anse calibrate (**Tabel 1**) realizându-se striuri în zig-zag pentru obținerea de colonii izolate.

Plăcile inoculate pentru detectarea de izolate de VRE și MRSA au fost incubate la 37°C ± 1°C for 18-22 h, iar pentru detectarea de izolate de *E. coli* ESBL și CRE la 37°C ± 1°C pentru 4 h, urmată de 44°C timp de 18-22 h.

S-au prelevat colonii individuale, cu morfologie corespunzătoare fenotipurilor de rezistență cercetate, și cultivate pe același mediu pentru menținerea presiunii selective și confirmarea fenotipului de rezistență.

Izolatele bacteriene au fost identificate prin spectroscopie de masa Maldi-Tof și analizate pentru detectarea de gene de rezistență la antibiotice prin PCR convențional și qPCR.

Rezultatele analizei celor 6 probe de gunoi de grajd privind prevalența fenotipurilor de rezistență: *E. coli* ESBL, CRE, MRSA și VRE sunt prezentate în **Tabelul 3**.

Tabelul 3. Rezultatele analizei probelor de gunoi de grajd pentru detectarea de fenotipuri de rezistență la antibiotice prin metode de cultivare directă și prin îmbogățire.

| Probă analizată | CV1 | CV2 | CV3 | CO4 | CV5 | CV6 |
|------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| Fenotip de rezistență | Metoda de cultivare directă | | | | | |
| <i>E. coli</i> ESBL | - | - | - | - | - | - |
| CRE | - | - | - | - | - | - |
| MRSA | - | - | - | - | - | - |
| VRE | + | + | + | - | + | - |
| | Metoda de cultivare prin îmbogățire | | | | | |
| <i>E. coli</i> ESBL | - | - | - | - | - | - |
| CRE | - | - | - | - | - | - |
| MRSA | | | | | | + |
| VRE | + | + | + | - | + | - |

Legendă: (-), absent; (+), prezent

Analiza probelor de gunoi de grajd prin **metode bazate pe cultivare (directă și prin îmbogățire) nu a pus în evidență fenotipurile de rezistență: *E. coli* ESBL și CRE**. Metoda de cultivare prin îmbogățire aplicată pentru detectarea fenotipului *E. coli* ESBL a condus, la izolarea de colonii cu morfologie necaracteristică, în toate probele de gunoi de grajd analizate (Figura 1).

Analiza probelor de gunoi de grajd prin **metode bazate pe cultivare prin îmbogățire a pus în evidență două izolate cu fenotip de rezistență MRSA numai în cazul probei CV6 (Figura 2)**.

Rezultatele au evidențiat prezența în toate probele de gunoi de grajd de tulpini de enterococi rezistenți la vancomicină, recuperate atât în urma cultivării după îmbogățire, cât și prin metoda directă de cultivare (**Figura 3**). Dintre acestea, un număr de 23 de tulpini cu fenotip VRE au fost selectate pentru analize ulterioare.

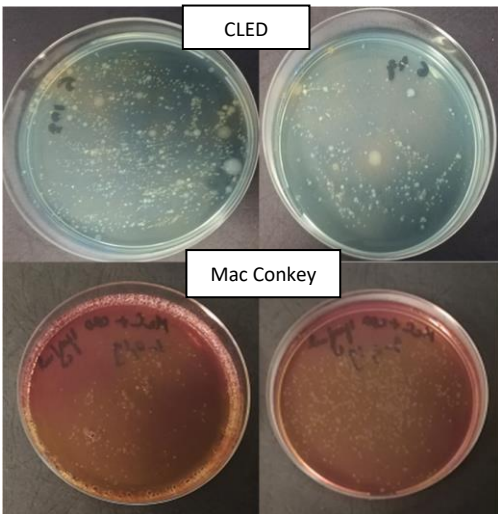


Figura 1. Aspectul coloniilor bacteriene cu morfologie necaracteristică / nespecifică fenotipului de rezistență *E. coli* ESBL obținute pe CLED agar suplimentat cu cefotaxim (2mg/L) și MacConkey agar suplimentat cu cefotaxim (2mg/L).



Figura 2. Aspectul culturilor celor două izolate cu fenotip MRSA caracteristic pe mediul MRSA agar.

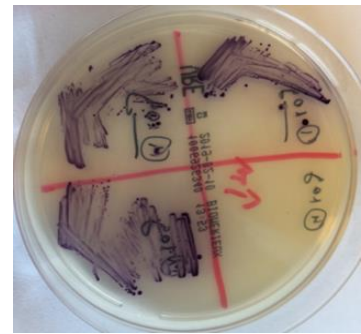


Figura 3. Aspectul culturilor cu fenotip caracteristic VRE obținute pe mediul ChromID VRE agar prin metoda de cultivare prin îmbogățire.

3.1.3. Analiza microbiologică preliminară a probelor de compost

De la o fermă de bovine de lapte din județul Mureș, cu peste 500 de capete, s-au prelevat 2 probe de compost:

- **AR01** – probă de compost prelevată în momentul golirii și împrăștierii pe terenul arabil a compostului
- **AR02** – probă de gunoi de grajd prelevată de la conducta de alimentare a bazinului de colectare în faza de umplere.

Probele au fost prelucrate conform protocolului optimizat– 10 g din probă suspendată în 2g/L tetrasodiupirofosfat a fost însămânțată ca atare și diluată (diluții zecimale până la 10^{-6}) pe medii selective.

Analiza datelor obținute a relevat faptul că cele două probe au încărcături microbiene diferite, proba de compost **AR01** fiind mai încărcată din punct de vedere microbiologic, comparativ cu proba **AR02** de gunoi de grajd necompostat (Tabelele 4-11).

Tabelul 4. Încărcătura microbiologică a probei AR01 obținută prin însămânțare directă (exprimată în UFC/mL)

| Diluție | 0 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
|----------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| PCA | | | 516000 | 860000 | 700000 | 4000000 | 0 |
| VRE | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| MRSA | + | + | + | + | | | |
| OXA 48 | 0 | 0 | | | | | |
| CARBA | 0 | 0 | | | | | |
| TBX | 7390 | 33400 | 30000 | 40000 | 0 | | |
| ESBL | 120 | 300 | | | | | |
| ESBL îns. 1 mL | 183 | | | | | | |

Tabelul 5. Confirmarea fenotipică a bacteriilor rezistente la antibiotice din proba de compost AR01 după etapa de îmbogățire (+ = reacție pozitivă; - = lipsa coloniilor caracteristice)

| Organism țintă | Mediu de cultură | Cantitate probă analizată | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| | | 0,1 g | 1 g | 1g | 10g | 10g | 10g |
| Nespecific | Plate count agar | + | + | + | + | + | + |
| VRE | ChromID VRE | + | + | + | + | + | + |
| MRSA | ChromID MRSA | + | + | + | + | + | + |
| <i>E. coli</i> | TBX | + | + | + | + | + | + |
| ESBL <i>E. coli</i> | TBX+1mg/mL cefotaxim | + | + | + | + | + | + |
| CRE | ChromID OXA48 | - | - | - | - | - | - |
| | ChromID | - | - | - | - | - | - |
| | CARBA | - | - | - | - | - | - |

Tabelul 6. Încărcătura microbiologică a probei AR02 obținută prin însămânțare directă (exprimată în UFC/mL)

| Diluție | 0 | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
|----------------|----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| PCA | | | 382000 | 540000 | 600000 | 28000000 | 70000000 |
| VRE | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| MRSA | + | + | + | - | | | |
| OXA 48 | 0 | 0 | | | | | |
| CARBA | 0 | 0 | | | | | |
| TBX | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| ESBL | 0 | 0 | | | | | |
| ESBL îns. 1 mL | 0 | | | | | | |

Tabelul 7. Confirmarea fenotipică a bacteriilor rezistente la antibiotice din proba de gunoi de grajd AR02 după etapa de îmbogățire (+ = reacție pozitivă; - = lipsa coloniilor caracteristice respectivului mediu)

| Organism țintă | Mediu de cultură | Cantitate probă analizată | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| | | 0,1 g | 1 g | 1g | 10g | 10g | 10g |
| Nespecific | Plate count agar | + | + | + | + | + | + |
| VRE | ChromID VRE | + | + | + | + | + | + |
| MRSA | ChromID MRSA | + | + | + | + | + | + |
| <i>E. coli</i> | TBX | + | + | + | + | + | + |
| ESBL <i>E. coli</i> | TBX+1mg/mL cefotaxim | + | + | + | + | + | + |
| CRE | ChromID OXA48 | - | - | - | - | - | - |
| | ChromID | - | - | - | - | - | - |
| | CARBA | - | - | - | - | - | - |

De la o **fermă de suine** din județul Mureș cu o capacitate de 10000 capete au fost recoltate două probe codificate:

- **AR03** – prelevată în momentul golirii și împrăștierii pe terenul arabil a compostului
- **AR04** – prelevată la punctul de umplere al bazinului pentru compost.

Tabelul 8. Încărcătura microbiologică a probei AR03 obținută prin însămânțare directă (exprimată în UFC/mL)

| Diluție | 0 | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
|---------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| PCA | | | 157000 | 200000 | 0 | 0 | 0 |
| VRE | + | + | + | 0 | | | |
| MRSA | + | + | + | 0 | | | |
| OXA 48 | 0 | 0 | | | | | |

| | | | | | | | |
|----------------|------|---|---|---|---|--|--|
| CARBA | 0 | 0 | | | | | |
| TBX | 1650 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| ESBL | 20 | 0 | | | | | |
| ESBL îns. 1 mL | 27 | | | | | | |

Tabelul 9. Confirmarea fenotipică a bacteriilor rezistente la antibiotice din proba de compost AR03 după etapa de îmbogățire (+ = reacție pozitivă; - = lipsa coloniilor caracteristice respectivului mediu)

| Organism țintă | Mediu de cultură | Cantitate probă analizată | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| | | 0,1 g | 1 g | 1g | 10g | 10g | 10g |
| Nespecific | Plate count agar | + | + | + | + | + | + |
| VRE | ChromID VRE | + | + | + | + | + | + |
| MRSA | ChromID MRSA | 0 | - | - | + | + | + |
| <i>E. coli</i> | TBX | + | + | + | + | + | + |
| ESBL <i>E. coli</i> | TBX+1mg/mL cefotaxim | + | + | + | + | + | + |
| CRE | ChromID OXA48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ChromID | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | CARBA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabelul 10. Încărcătura microbiologică a probei AR04 obținută prin însămânțare directă (exprimată în UFC/mL)

| Diluție | 0 | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
|----------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| PCA | | | 30000 | 1100000 | 10100000 | 38x10 ⁶ | 13x10 ⁷ |
| VRE | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| MRSA | + | + | 0 | 0 | | | |
| OXA 48 | 0 | 0 | | | | | |
| CARBA | 0 | 0 | | | | | |
| TBX | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| ESBL | 0 | 0 | | | | | |
| ESBL îns. 1 mL | 0 | | | | | | |

Tabelul 11. Confirmarea fenotipică a bacteriilor rezistente la antibiotice din proba de gunoi de grajd AR04 după etapa de îmbogățire (+ = reacție pozitivă; - = lipsa coloniilor caracteristice respectivului mediu)

| Organism țintă | Mediu de cultură | Cantitate probă analizată | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----|----|-----|-----|-----|
| | | 0,1 g | 1 g | 1g | 10g | 10g | 10g |
| Nespecific | Plate count agar | + | + | + | + | + | + |
| VRE | ChromID VRE | + | + | + | + | + | + |
| MRSA | ChromID MRSA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. coli</i> | TBX | 0 | + | + | + | + | + |
| ESBL <i>E. coli</i> | TBX+1mg/mL cefotaxim | + | 0 | 0 | + | + | + |
| CRE | ChromID OXA48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ChromID CARBA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Activitatea 2.2. Identificarea bacteriilor rezistente izolate

Un număr de **57 izolate cu morfologie necaracteristică/ nespecifică fenotipului *E. coli* ESBL** au fost selectate pentru identificare și studiul profilurilor de rezistență la antibiotice. Identificarea izolatelor bacteriene cu fenotipuri de rezistență nespecifice s-a efectuat cu ajutorul sistemului automat Vitek (Biomerieux). Izolatele au aparținut următoarelor specii bacteriene: *Alcaligenes faecalis* (1), *Acinetobacter baumannii complex* (16), *A. haemolyticus* (1), *Achromobacter denitrificans* (7), *A. xylosoxidans* (3), *A. spanius* (1), *Bordetella petrii* (3), *Castellaniella defragrans* (1), *Pseudomonas guariconensis* (3), *P. putida* (4), *P. guariconensis* (3), *P. citrinellolis* (1),

P. aeruginosa (4), *P. mendocina* (5), *P. alcaligenes* (1), *P. jinjuensis* (1), *Pandora sp.* (2) *Ochrobactrum intermedium* (4).

Analiza de **spectrometrie de masă Maldi-Tof** aplicată pentru cele două **izolate cu fenotip MRSA a condus la identificarea tulpinilor respective ca aparținând speciei *Staphylococcus sciuri***. Din cele **23 tulpini cu fenotip VRE**, 21 de tulpini au fost confirmate în urma **identificării Maldi-Tof ca fiind *Enterococcus faecium* și 2 tulpini ca *Staphylococcus warneri***.

Activitatea 2.3. Determinarea profilului de rezistență la antibiotice a tulpinilor izolate

Analiza profilurilor de rezistență la antibiotice ale tulpinilor *A. baumannii complex* au evidențiat faptul că acestea sunt rezistente sau intermediar rezistente la cefalosporinele de generația a III-a, ceea ce explică dezvoltarea acestora pe mediile suplimentate cu aceste antibiotice.

De asemenea, un număr total de 45 colonii nespecifice izolate de pe mediile ChromID CARBA și ChromID OXA agar au fost analizate pentru confirmarea producerii de carbapenemaze prin testul Blue-carba, însă cu 2 excepții, toate tulpinile au fost negative. Analiza PCR pentru detectarea genelor codificatoare pentru carbapenemaze (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*) a arătat că toate tulpinile au fost negative pentru genele investigate.

Tulpina bacteriană cu fenotip MRSA identificată ca *S. sciuri* a fost analizată pentru detectarea genei *mecA* prin PCR (primerii utilizați au fost *mecA1* TCCAGATTACAACCTTCACCAGG, *mecA2* CCACTTCATATCTTGTAACG, Strommenger et al., 2003). Reacția a fost efectuată într-un volum final de 20 μL cu un conținut de 1X tampon de reacție (Promega Corporation, Madison, WI, SUA), 1,2 μL MgCl₂ (2 mM), 0,2 μL dNTPs, primeri *mecA1* și *mecA2* (0,3 μM fiecare), 0,025 U Taq ADN polimerază (Promega) și apă distilată serilă.

Rezultatele analizei a pus în evidență prezența genei care conferă rezistența la meticilină, ceea ce explică creșterea acesteia pe mediu selectiv pentru MRSA, însă tulpina a fost negativă pentru gena *nuc*, marker molecular pentru specia *S. aureus* (Figura 4).

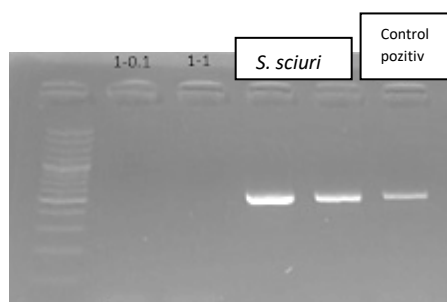


Figura 4. Electroforeza în gel de agaroză pentru ampliconii genei *mecA* (532bp).

Tulpinile de *E. faecium* și *S. warneri* izolate din probele de gunoi de grajd au fost analizate prin tehnica PCR convențional pentru evidențierea genelor de rezistență la vancomicină: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD* și *vanG*. Secvențele primerilor utilizați și protocoalele de lucru sunt ilustrate în Tabelul 12. Reacțiile PCR au fost efectuate într-un volum

final de 20 μ L cu un conținut de 1X tampon de reacție (Promega Corporation, Madison, WI, SUA), 1,2 μ L $MgCl_2$ (2 mM), 0,2 μ L dNTPs, primeri (0,3 μ M fiecare), 0,025 U Taq ADN polimerază (Promega) și apă distilată serilă.

Tabelul 12. Pimeri utilizați pentru detecția genelor van A-G (Dutka-Malen et al., 1995, Lopez et al., 2013)

| Gene | Denumire | Secvența 5'-3' | Dimensiune amplicon |
|-------------|----------|------------------------|---------------------|
| <i>vanA</i> | F | GGGAAAACGACAATTGC | 732pb |
| | R | GTACAATGCGGCCGTTA | |
| <i>vanB</i> | F | AAGCTATGCAAGAAGCCATG | 536 |
| | R | CCGACAATCAAATCATCCTC | |
| <i>vanC</i> | F | GGTATCAAGGAAACCTC | 822 |
| | R | CTTCCGCCATCATAGCT | |
| <i>vanD</i> | F | TGTGGGATGCGATATTCAA | 500 |
| | R | TGCAGCCAAGTATCCGGTAA | |
| <i>vanE</i> | F | TGTGGGATCGGAGCTGCAG | 455 |
| | R | GGCTGGGTGAAGTAAAGTGAC | |
| <i>vanG</i> | F | CGGCATCCGCTGTTTTTGA | 941 |
| | R | GAACGATAGACCAATGCCTT | |
| <i>mexA</i> | F | TCCAGATTACAACCTCACCAGG | 162 |
| | R | CCACTTCATATCTTGTAACG | |

Rezultatele au arătat că 22 / 23 tulpini au fost pozitive pentru gena *vanA* (Figura 5, Tabelul 13).



Figura 5. Electroforeza în gel de agaroză pentru ampliconii genei *vanA* (732bp).

Tabelul 13. Rezultatele analizei genelor de rezistență la vancomicină detectate prin tehnica PCR la tulpinile cu fenotip VRE izolate din probe de gunoi de grajd.

| Proba de gunoi de grajd (Număr izolate analizate) | CV1 (6) | CV2 (6) | CV3 (6) | CV5 (5) |
|--|------------|------------|------------|------------|
| <i>vanA</i> | + | + | + | + |
| <i>vanB</i> | - | - | - | - |
| <i>vanC</i> | - | - | - | - |
| <i>vanD</i> | - | - | - | - |
| <i>vanG</i> | - | - | - | - |

➤ **Activitatea 2.4. Extractia ADN din probele biologice recoltate și realizarea reacțiilor qPCR pentru gene reprezentative selectate**

2.4.1. Extractia ADN din probele biologice recoltate

Pentru optimizarea protocolului de extracție ADN din probe de gunoi de grajd au fost utilizate două metode: metoda clasică cu fenol-cloroform și precipitare cu izopropanol și metoda bazată pe kitul *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen).

1. Etapele metodei clasice de izolare ADN total bazat pe extracție fenol-cloroform și precipitare cu izopropanol.

- S-au adăugat 100 mg de probă într-un tub de 1,5 ml împreună cu 200 mg bile de sticlă cu diametrul de 0,1 mm, 500 μl tampon de liză (SDS 0,5%; 50 mMNaCl, 500 mMTris-HCl [pH 8]) și 400 μl de fenol: CIA-v/v (cloroform : alcool izoamilic).
- Probele au fost vortexate la viteză maximă timp de 3 min și centrifugate la 6.000 x g timp de 5 min la temperatura camerei.
- Supernatantul a fost transferat într-un tub curat de 1,5 ml cu CIA v/v și vortexat timp de 2 minute.
- Probele au fost centrifugate la 7.000 x g timp de 3 min și evitând sedimentul, supernatantul a fost transferat într-un tub curat de 1,5 ml.
- Precipitarea acizilor nucleici s-a realizat cu 600 μl isopropanol.
- Probele au fost centrifugate la 13.000 x g timp de 15 min.
- Sedimentul de ADN a fost resuspendat în 20 μl de tampon TE și conservat la -20 °C

Cuantificarea concentrației și a gradului de puritate a ADN izolat s-a analizat spectrofotometric cu ajutorul uni Nanodrop (NanoDrop 8000, Thermo Fisher Scientific, USA). Soluția de ADN obținut pe baza acestui protocol nu a fost contaminată cu proteine/ARN însă concentrațiile ADN obținute au fost scăzute (Tabelul 14).

Tabelul 14. Analiza concentrației și purității soluțiilor de ADN izolat din probe de gunoi de grajd prin metode clasice de extracție.

| Cod probă analizată | DNA conc. ng/μL | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|---------------------|-----------------|------------------------------------|
| CV1 | 11.3 | 2.1 |
| CV2 | 32 | 2.22 |
| CV3 | 90 | 1.82 |
| CO4 | 10.2 | 1.76 |
| CV5 | 40 | 1.73 |
| CV6 | 8 | 1.63 |

2. Etapele protocolului de extracție ADN din probe de gunoi de grajd cu ajutorul kitului *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) sunt ilustrate în figura 6. Pe scurt, 200 mg probă au fost lizate chimic și termic (prin adăugarea de tampon de liză și incubarea la 70°C), iar ADN-ul din probă a fost fixat prin incubare cu tampon ASL. ADN ul a fost

precipitat cu etanol și fixat pe o colonă de purificare. După spălări succesive (cu tampon de spălare specifice kit-ului de extracție, AW1 și AW2), ADN-ul a fost eluat în tampon ATE și stocat la -20°C.

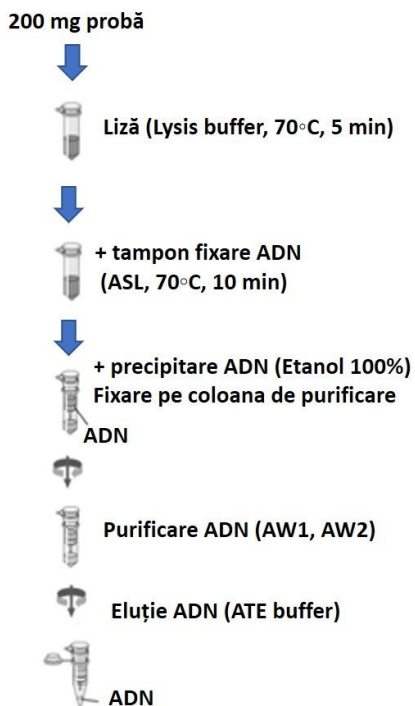


Figura 6. Etapele procesului de extracție ADN

Tabelul 15. Analiza concentrației și purității soluțiilor de ADN izolat din probe de gunoi de grajd prin metoda bazată pe kitul *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*.

| Probă (proveniență) | DNA conc. ng/μL | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Fermă porcine, golire (AR03) | 103 | 2.0 |
| Bovine golire (AR01) | 188 | 2.2 |
| Porcine umplere (AR04) | 97.25 | 1.92 |
| Bovine umplere (AR02) | 114.5 | 1.96 |

2.4.2. Realizarea reacțiilor qPCR pentru gene reprezentative selectate

Amplificarea prin *Real Time PCR* pentru detecția de gene de rezistență s-a efectuat pe un sistem PCR *ViiA 7* (*Applied Biosystems*), utilizând controlul endogen reprezentat de ADN ribosomal 16S. O cantitate de 10 ng ADN a fost supusă reacției de Real time PCR (qPCR) pentru expresia genelor de rezistență *bla_{NDM-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* și *bla_{oxa48}* folosind *SYBR Green* conform indicațiilor producătorului (*Applied Biosystems*). Secvențele primerilor utilizați sunt prezentate în tabelul 6.

Tabel 6. Secvențele primerilor utilizați pentru RT PCR (Poirel et al, 2011 și Dollinger, 1992, Matsuki, 2004)

| Gene | Denumire | Secvența 5'-3' | T _m |
|----------------------|----------|-----------------------------|----------------|
| 16S rRNA | UniF340 | ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT | 60°C |
| | UniR514 | ATT ACC GCG GCT GCT GGC | |
| bla _{oxa48} | F | GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC | 60°C |
| | R | CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG | |
| bla _{ndm} | F | GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC | 58°C |
| | R | CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC | |
| bla _{SHV} | F | GGTTATGCGTTATATTGCGCC | 60°C |
| | R | TTAGCTTGCCAGTGCTC | |
| bla _{CTX-M} | F | CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG | 60°C |
| | R | GGCTGGGTGAAGTAAAGTGAC | |

Rezultatele analizei de amplificare au arătat că **toate probele analizate au fost negative pentru genele bla_{ndm}, bla_{SHV} și bla_{CTX-M}**. Pentru toate probele analizate, s-a obținut amplificare pentru ADNr 16S și pentru gena de rezistență bla_{oxa48}. Figura 7 ilustrează pragul de detecție a genelor de interes (Ct- threshold cycle/ciclu prag)- cu cât valoarea acestuia este mai mica, cu atât abundența genei este mai ridicată.

Toate cele 4 tipuri de probe luate in studiu au prezentat niveluri similare de expresie a ADNr 16S și a genei de rezistență bla_{oxa48}.

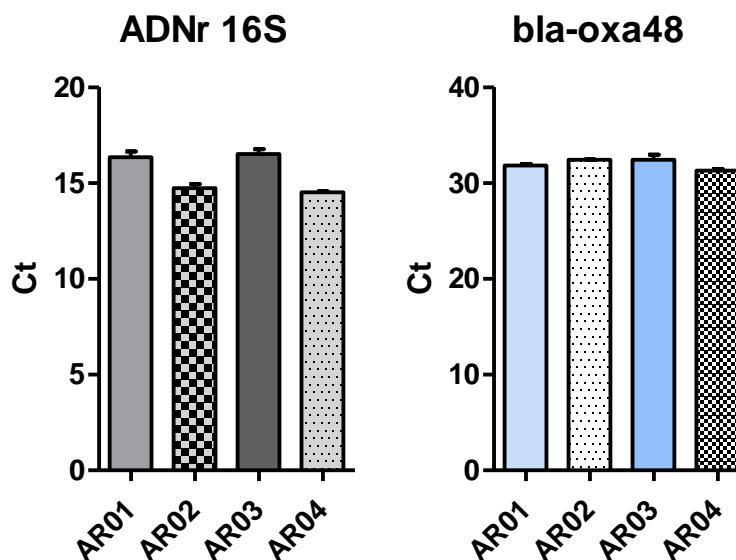
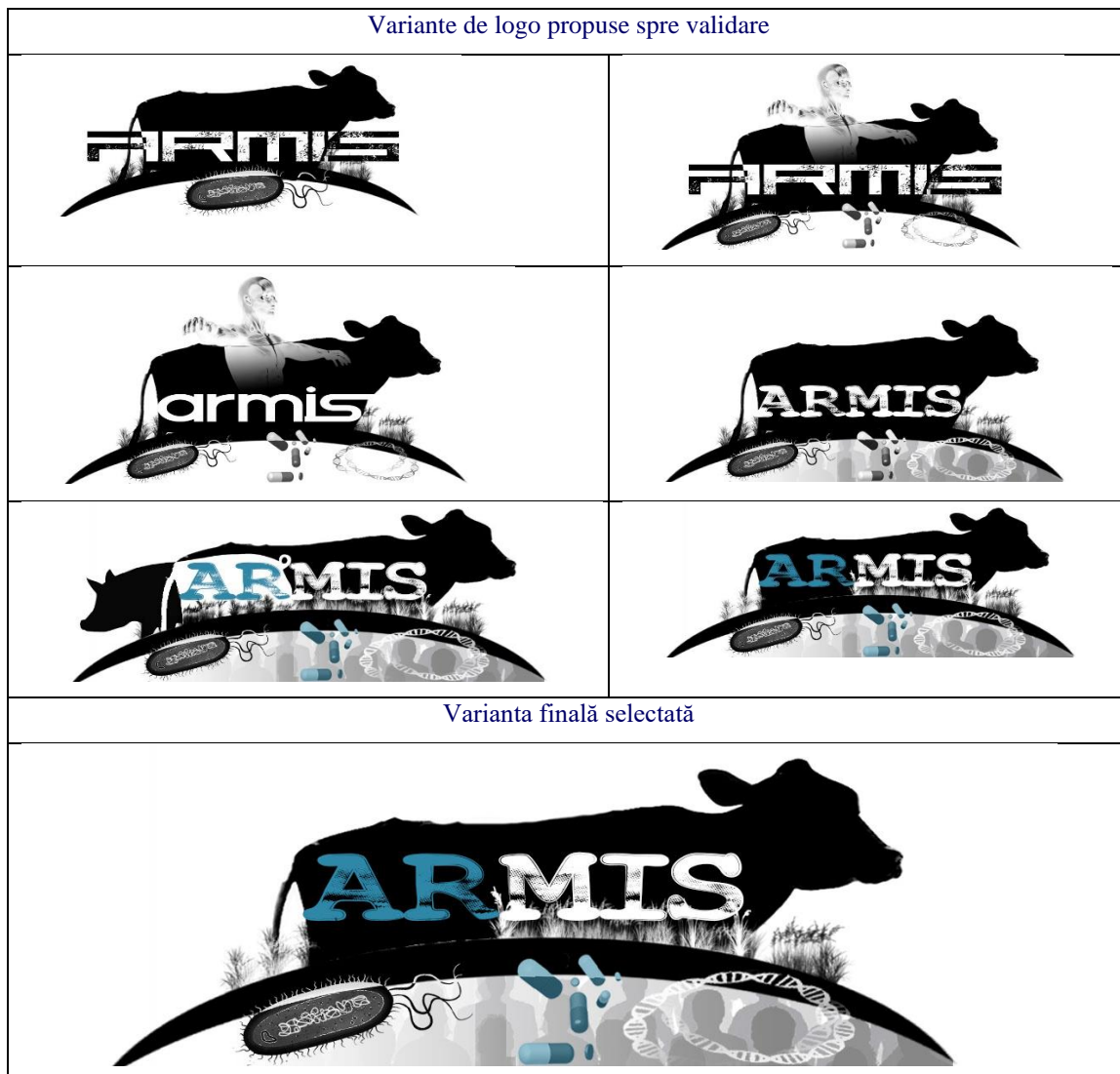


Figura 7. Amplificare prin qRT-PCR a genei ADN ribosomal 16S și a genei bla_{oxa48}.

➤ Activitatea 2.5. Managementul proiectului

În cadrul teleconferințelor care au avut loc la fiecare 6 săptămâni, au fost agreate procedurile de lucru standardizate, ce urmează a fi utilizate pentru izolarea și confirmarea tulpinilor rezistente.

De asemenea, partenerul român a realizat 6 variante de logo- al proiectului, dintre care a fost agreată varianta finală.



Diseminarea rezultatelor

Articole BDI

Robert Ducu, Irina Gheorghe, Mariana Carmen Chifiriuc, Grigore Mihăescu, Ionela Sârbu. Prevalence of vancomycin resistance phenotypes among *Enterococcus* species isolated from clinical samples in a Romanian hospital. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 9 (6), 2019, 4699 – 4704. [file:///C:/Users/Carmen/Downloads/2069583796699704%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Carmen/Downloads/2069583796699704%20(1).pdf)

N.B. În ceea ce privește diseminarea rezultatelor, partenerii din cadrul consorțiului au agreat un plan de diseminare, care prevede ca **publicarea rezultatelor importante** obținute să se realizeze la finalul proiectului, **în reviste cu factor de impact foarte ridicat**. De aceea, pe parcursul proiectului, partenerii pot publica doar rezultatele secundare obținute, care nu vor face **obiectul publicațiilor majore**.

Conferințe internaționale

1. Othman Thamer Almahdawy, Irina Gheorghe, Omar Sadik Shalal, Dunya Alkurjia, Luminita Marutescu, Marcela Popa, Grigore Mihaescu, Otilia Banu, Carmen Chifiriuc. Resistance and virulence genes profiles in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from hospitalised patients in Bucharest, Romania. P2327, 29th ECCMID, Amsterdam, Netherlands, 13-16 April 2019.

Teza de doctorat

1. Othman Thamer Almahdawy- *Virulence and resistance markers in Gram-positive cocci of clinical importance*. Universitatea din București, 2019.

Teza de dizertație

2. Mita Ioana- *Identificarea unor tulpini bacteriene rezistente la antibiotice în probe de gunoi de grajd*. Universitatea din Bucuresti, 2019

Teză de licență

Oana Marinescu - *Optimizarea unor metode de izolare și cuantificare a enterococilor rezistenți la vancomicină în probe de compost*, 2019

Concluzii

În cadrul acestei etape au fost selectate patru ferme (două de suine și două de bovine), care îndeplinesc criteriile de selecție referitoare la capacitatea totală, volumul bazinelor de depozitare a gunoierului de grajd și modul de procesare prin compostare și a fost realizată prima campanie de recoltare a probelor.

A fost optimizat protocolul de izolare a speciilor țintă, respectiv *S. aureus* rezistent la meticilină (două etape de îmbogățire în mediu suplimentat cu cefoxitin) și tulpini de enterobacterii rezistente la cefalosporine de generația a treia și la carbapeneme (incubare la temperatura de 44°C și utilizarea mediului TBX pentru izolare).

În urma analizei probelor recoltate prin aplicarea protocoalelor agreate în cadrul consorțiului au fost izolate din probele de compost toate fenotipurile de rezistenți țintite, cu excepția fenotipului producător de carbapenemaze.

Referințe

1. Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4089-4094. Lopez, M., Tenorio, C., & Torres, C. (2013). Study of vancomycin resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. *Zoonoses and public health*, 60(2), 160-167
2. Dutka-Malen, S., Evers, S., & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33(1), 24-27.
3. Laurent Poirel, Timothy R. Walsh, Vincent Cuvillier, Patrice Nordmann. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(11)119-123
4. R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10(4):413-7.

5. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T TR. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Env Microbiol.* 2004; 70: 7220–8. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7220- 7228.2004