

RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ RST – Raport științific și tehnic *in extenso*
ETAPA III. Caracterizarea resistomului prin metode independente de cultivare

Perioada raportată - 01/01/2019 - 31/12/2019

Titlul proiectului: *Antibiotic Resistance in Wastewater: Transmission Risks for Employees and Residents around Waste Water Treatment Plants* / Rezistența la antibiotice în apele uzate: Riscuri de transmitere la angajați și la rezidenții din proximitatea stațiilor de tratare apelor reziduale (SEAU).

Acronimul proiectului: AWARE-WWTP

Cod proiect: ERANET-JPI-EC-AMR -AWARE-WWTP Nr. Contract: 26 din 01/06/2017 Durata:36 luni (01.06.2017 – 30.05.2020)

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

Parteneri

1. Coordonator: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman
2. Partener 1: Klinikum der Universität München, Institute and Outpatient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine, München: Prof. Dr. Katja Radon, MSc
3. Partener 2: Ludwig-Maximilians-Universität München, Max von Pettenkofer-Institut, München: PD Dr. med. Andreas Wieser
4. Partener 3: University of Gothenburg, Institute of Biomedicine, Department of Infectious Diseases, Göteborg, Sweden: Prof. Dr. Joakim Larsson
5. Partener 4: Research Institute of the University of Bucharest, Faculty of Biology: Prof. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc

ETAPA 3. CARACTERIZAREA REZISTOMULUI PRIN METODE INDEPENDENTE DE CULTIVARE

CUPRINS

1	Obiectivele/activitățile etapei.....	1
2	Rezumatul etapei	2
3	Descrierea științifică și tehnică.....	4
4	Diseminarea rezultatelor.....	17
5	Bibliografie.....	20

1. OBIECTIVELE/ACTIVITĂȚILE ETAPEI

- ↗ Analiza metagenomica a unor probe selectate de ape uzate, de aer și de materii fecale (pentru identificarea de noi gene de rezistență și pentru determinarea abundenței relative a unor gene de rezistență selectate)
- ↗ Stabilirea eficienței diferitelor trepte de tratare a apelor uzate în ceea ce privește reducerea nivelului de antibiorezistență
- ↗ Diseminarea rezultatelor
- ↗ Managementul proiectului

1. REZUMATUL ETAPEI

În cadrul etapei a treia a proiectului *Caracterizarea rezistomului prin metode independente de cultivare* s-a realizat optimizarea procesului de extracție ADN pentru analiza metagenomică a probelor de apă uzate recoltate din stațiile de epurare a apelor uzate (SEAU) sau din proximitatea acestora și a probelor de materii fecale. Pentru izolarea ADN din probe de scaun s-a utilizat kit-ul *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen). În ceea ce privește extracția ADN din filtre de apă, în funcție de tipul de proba filtrată și de încărcătura microbiană a acesteia, volumele utilizate pentru extracția ADN au fost diferite (de la 100 ml pentru probele de efluent/influent/nămol tanc de aerare până la 500 ml în cazul probelor de apă de suprafață din aval/amonte de stația de epurare). Izolarea ADN din probele de apă s-a realizat cu ajutorul kitului comercial *DNeasy PowerWater*. Concentrația și gradul de contaminare cu proteine și polizaharide au fost determinate spectrofotometric (Nanodrop, Thermo Scientific). Aplicarea protocoalelor de extracție a condus la obținerea unor concentrații ridicate de ADN cu un grad înalt de puritate, condiții de calitate esențiale pentru analizele ulterioare de qRT-PCR și secvențiere. În această etapă de implementare a proiectului s-a realizat extracția ADN pentru 300 probe de materii fecale (70 lucrători, 130 rezidenți apropiere, 100 rezidenți depărtare) și circa 30 de probe de apă.

În continuare, a fost optimizată metoda de evaluare a abundenței genelor de rezistență la antibiotice (ARG), în probe de apă și materii fecale prin *Real Time PCR* cantitativ (qRT-PCR). Amplificarea prin qRT-PCR pentru detecția ARG la β -lactamice s-a efectuat pe un aparat PCR *ViiA 7* (*Applied Biosystems*). Tehnica permite cuantificarea cantității inițiale a fragmentului de ADN țintă dintr-o probă. Marcarea specifică fluorescentă a ADN se poate realiza prin mai multe metode, cea mai simplă metodă fiind utilizarea unui fluorocrom, intensitatea fluorescenței fiind direct proporțională cu acumularea ampliconilor în timpul reacției PCR. Reacția de qRT-PCR a fost optimizată pentru detectarea prezenței și abundenței relative a genelor de rezistență *bla_{NDM-1}* și *bla_{OXA48}* folosind ADN ribosomal 16S, indicator al prezenței de eubacterii, drept control endogen și fluorocromul *SYBR Green*. Pentru toate probele de apă uzată analizate s-a obținut amplificare pentru ADNr 16S, nivelul cel mai ridicat fiind înregistrat pentru probele de influent (ciclul prag de detecție prin qRT-PCR a genei ADNr 16S fiind în jurul valorii de 15, comparativ cu probele de influent pentru care ciclul prag a avut valoarea 12). Abundența ADNr16S a fost cuantificată în toate probele de scaun colectate de la lucrătorii stațiilor de epurare, precum și de la rezidenții din zone adiacente/la depărtare de stațiile de epurare luate în studiu, Ct pentru probele de scaun variind de la 11 la 15. ARG *bla_{OXA48}* a fost detectată cu niveluri scăzute în probele de apă analizate (nămol reîntors, nămol activ, influent) cu o valoare medie a ciclului prag Ct de 32. Pentru probele de apă analizate până în prezent nu s-a detectat gena *bla_{NDM}* prin qRT-PCR. În următoarea etapă de implementare a proiectului, se va continua *screening*-ul pentru genele *bla_{NDM}*/*bla_{OXA48}* cât și pentru alte gene de rezistență, pe un lot mai mare de probe de apă, prelevate din România, dar și din Olanda și Germania.

Probele de materii fecale colectate de la lucrătorii stației de epurare și de la rezidenți (din apropiere și de la depărtare de stațiile de epurare) au prezentat amplificare pentru ambele gene de rezistență luate în studiu (*bla_{OXA48}*, *bla_{NDM}*). S-a observat că în cazul lucrătorilor de la SEAU NE, nivelele *bla_{OXA48}* și *bla_{NDM}* sunt mai crescute, comparativ cu rezidenții, din apropierea stației, fie de la depărtare. Analiza rezultatelor obținute până în momentul de față nu a relevat însă diferențe semnificative statistice.

Stabilirea eficienței diferitelor trepte de tratare a apelor uzate în ceea ce privește reducerea nivelului de antibioretistență s-a realizat pentru un număr de 6 SEAU din România, localizate în sudul țării (Sud 1, Sud 2, Centru Sud) NE, SE și V. În acest scop au fost utilizate metode cantitative pentru determinarea gradului de reducere a încărcăturii microbiene cu tulpini de *Enterobacteriaceae* (*E. coli* și grupul KESC = *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*

și *Citrobacter*), producătoare de beta-lactamaze de spectru extins (ESBL) și carbapenemaze (CARBA și OXA) (metoda membranei filtrante, utilizând medii de cultură cromogene suplimentate cu antibiotice) și respectiv a gradului de reducere a anumitor ARG.

Dinamica prevalenței fenotipurilor de rezistență: *E.coli* ESBL, *E.coli* CARBA *E. coli* OXA, KESC ESBL, KESC CARBA și KESC OXA de-a lungul celor șase situsuri de prelevare, respectiv amonte SEAU, influent SEAU, nămol activ tanc de aerare, nămol reîntors, efluent și aval) a arătat că tehnologiile de epurare ale celor șase SEAU analizate au redus abundența fenotipurilor de *Enterobacteriaceae* rezistente la antibiotice: ESBL, CARBA și OXA, cu intensitate variabilă, cu 1 până la 4 log.

Screening-ul ARG la tulpinile de *Enterobacteriaceae* colectate de la nivelul stațiilor SEAU Sud1 și SEAU Sud2, prin tehnica PCR convențional a condus la detectarea acestora (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}) în toate punctele de prelevare (influent, nămol activ tanc de aerare, nămol rezidual, efluent, amonte stație și aval stație), fapt ce sugerează că tehnologiile de epurare ale acestor stații nu sunt eficiente în reducerea abundenței ARG.

Rezultatele obținute au fost diseminate parțial prin următoarele tipuri de rezultate : 1 articol ISI acceptat pentru publicare), 1 articol BDI, 1 lucrare de disertație în cadrul căreia a fost optimizat un soft de numărare a coloniilor rezistente, 6 prezentări de tip poster la conferințe naționale și internaționale (29th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-ECCMID*, Zilele științifice ale Institutului National de Boli Infecțioase, 15th *International Symposium "Priorities of Chemistry for a Sustainable Development"*, 8th *Congress of European Microbiologists*) și un atelier de lucru, la care au participat reprezentanți ai tuturor țărilor membre ale consorțiului (România, Germania, Olanda, Suedia-teleconferință).

Toate obiectivele și activitățile asumate de partenerul român pentru această etapă au fost îndeplinite în totalitate.

Diseminarea rezultatelor Articole

ISI

Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania, Dan Otelea, Marius Surleac, Ilda Czobor Barbu, Simona Paraschiv, Laura Ioana Popa, Irina Gheorghe, Luminita Marutescu, Marcela Popa, Ionela Sarbu, Daniela Talapan, Mihai Nita, Alina Viorica Iancu, Manuela Arbune, Alina Manole, Stefan Nicolescu, Oana Sandulescu, Adrian Streinu-Cercel, Mariana Carmen Chifiriuc, Plos One, Manuscript nr: PONE-D-19-23806R1, articol acceptat

BDI

Do wastewater treatment plants increase antibiotic resistant bacteria or genes in the environment? Protocol for a systematic review, Rodríguez-Molina Daloha, Mang Petra, Schmitt Heike, Chifiriuc Mariana Carmen, Radon Katja, Wengenroth Laura, PeerJ Preprints, 7:e27727v1

Participări la conferințe internaționale

Poster

- ↗ Genetic background of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains recovered from a wastewater treatment plant near Bucharest, Romania, Gheorghe Irina, Czobor Ilda, Avram Ionela, Alshaikhli Nawfal, Popa Laura Ioana, Popa Marcela, Pîrcălabioru-Grădișteanu Grațîela, Neguț Alina Cristin, Măruțescu Luminița, Lazăr Veronica, Chifiriuc Mariana Carmen, 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Olanda, 13 - 16 Aprilie 2019.
- ↗ Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from wastewater treatment plant in Romania, Czobor Ilda, Popa Laura Ioana, Gheorghe Irina, Avram Ionela, Neguț Alina Cristina, Ilda Czobor, Pîrcălabioru-Grădișteanu Grațîela, Lazăr Veronica, Chifiriuc Mariana Carmen, 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Olanda, 13 - 16 Aprilie 2019.
- ↗ Detection of the epidemic IncP-6 plasmid carrying blaKPC-2 in a multidrug-resistant *Enterobacter kobei* isolate from activated sludge of a wastewater treatment plant in Valcea County, Romania, Czobor Ilda, Avram Ionela, Gheorghe Irina, Popa Laura Ioana, Măruțescu Luminița, Popa Marcela, Pîrcălabioru-Grădișteanu Grațîela, Lazăr Veronica, Chifiriuc Mariana Carmen, 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Olanda, 13 - 16 Aprilie 2019.
- ↗ NGS analysis workflows to generate ARGs profiles between clinical and waste water *K pneumoniae* strains in Romania, Marius Surleac, Simona Paraschiv, Ilda Czobor, Laura Popa, Irina Gheorghe, Daniela Talapan, Mariana Carmen Chifiriuc, Dan Otelea, Zilele științifice ale Institutului National de Boli Infectioase "Prof. Dr. Matei Bals" - editia XV, București, 30 oct-01 nov 2019
- ↗ Antibiotic Incidence, Distribution and Resistance in Wastewaters, Anton Ficăi, Denisa Ficăi, Bogdan Stefan Vasile, Dan Eduard Mihaiescu, Bogdan Purcarea, Marcela Popa, Mariana Carmen Chifiriuc, 15th International Symposium "Priorities of Chemistry for a Sustainable Development", București, 30.10-01.11.2019.

- ↗ Co-occurrence of heavy metals and extended-spectrum beta-lactamase resistances genes in Enterobacteriaceae strains isolated along the whole course of a river in Romania, Luminita Gabriela Marutescu, Marcela Popa, Irina Gheorghe, Ilda Czobor, Andreea Cretu, Carmen Curutiu, Ioan Pacesila, Mariana Carmen Chifiriuc, 8th Congress of European Microbiologists, 07-11 iulie 2019, Glasgow, Scotland.

Lucrare de disertație, 2019, Sârghie Larisa, Dezvoltarea unui software pentru analize microbiologice cantitative