

**RST – Raport științific și tehnic *in extenso***

**Etapa 3. Continuarea și finalizarea etapei de recoltare a probelor și analiza bacteriologică și moleculară a acestora**

**Perioada de raportare: 28/12/2019 — 29/12/2020**

**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**

<b>1. Obiective/activități prevăzute</b>	
<b>2. Rezumatul etapei</b>	
<b>3. Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor</b>	
<b>4. Diseminarea rezultatelor</b>	
<b>5. Bibliografie</b>	

**1. OBIECTIVE/ACTIVITĂȚI PREVĂZUTE**

- Activitatea 3.1. Recoltarea probelor de la fermele de animale și izolarea de bacterii rezistente la antibiotice
- Activitatea 3.2. Identificare și caracterizarea bacteriilor rezistente izolate în 2020
- Activitatea 3.3. Determinarea profilului de rezistență la antibiotice a tulpinilor izolate în 2020
- Activitatea 3.4. Extracția ADN din probele biologice recoltate în 2020 și realizarea reacțiilor qPCR pentru gene reprezentative selectate
- Activitatea 3.5. Managementul proiectului

## 2. REZUMATUL ETAPEI

În cadrul acestei etape a proiectului, s-a continuat prelevarea unui număr total de 67 de probe de la 3 ferme de porcine, 2 ferme de bovine, precum și de la 2 ferme de bovine cu stație de biogaz. Recoltările s-au efectuat în decembrie 2019, și în lunile ianuarie, februarie și iunie 2020, din diferite puncte de prelevare (bazine de în diferite faze de compostare sau platforme de depozitare a gunoiului de grajd, digestoare, probe lichide și solide, rezultate în urma obținerii biogazului).

Probele recoltate au fost analizate prin două metode bazate pe cultivare: metoda directă și metoda cultivării prin îmbogățir pentru izolarea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice reprezentate de: enterococi rezistenți la vancomicină (VRE), *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), *Escherichia coli* producătoare de beta-lactamaze de spectru extins (ESBL) și *Enterobacteriaceae* producătoare de carbapenemaze (CRE).

În urma analizei microbiologice au fost izolate și stocate un număr de 1250 de tulpini rezistente la antibiotice, care au fost identificate prin spectrometrie de masă, cu tehnologia Maldi-Tof. Toate cele 247 de tulpini ESBL cu fenotip au fost identificate ca *E. coli*. Tulpinile de identificate prezumtiv ca enterococi rezistenți la vancomicină au fost în principal identificate ca *Pediococcus* sp., o bacterie Gram pozitivă, aparținând bacteriilor lactice, care este utilizată pentru inocularea silozurilor și care prezintă atât efect probiotic, cât și antimicrobian. Din cele 130 tulpini cu fenotip MRSA analizate în vederea identificării, doar o mică parte au fost confirmate, majoritatea aparținând speciilor *Paenibacillus* sp. și *Cellulosimicrobium* sp.

Determinarea profilului de rezistență la antibiotice a tulpinilor de *E. coli* fost realizată cu ajutorul sistemului *Sensititre ThermoFisher Scientific*. Nivelul și profilul de rezistență variază de la o fermă la alta, cele mai multe tulpini fiind rezistente la ampicilină, sulfametoxazol, trimetoprim și tetracilină.

În cadrul acestei etape s-a realizat un screening-ul PCR pentru determinarea unor gene de rezistență la antibiotice dintre care vor fi selectate ulterior ca gene-țintă pentru qPCR-array, utilizând primeri specifici pentru gene transferabile de rezistență la antibiotice cu importanță clinică. În cazul tulpinilor de enterobacterii s-a remarcat prezența genelor codificatoare pentru ESBL de tip *bla*<sub>CTX-M</sub> (97%), *bla*<sub>TEM</sub> (35%) și *bla*<sub>SHV</sub> (5%). Au fost detectate de asemenea genele transferabile de rezistență la colistin *mcr-1* și *mcr-3*, a căror prezență nu a fost descrisă până acum pe teritoriul țării noastre, precum și genele de rezistență la quinolone *qnrA* și *qnrB*. Pentru tulpinile de *S. aureus* s-a identificat prezența genei *mecA* de rezistență la meticilină. Pentru analiza metagenomică a probelor de gunoi de grajd s-a realizat până în prezent extracția ADN din 29 de probe de gunoi de grajd, cu kitul [QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit](#) (Qiagen). Aplicarea protocolului pentru extracție a condus la obținerea de soluții de ADN cu concentrații ridicate (16,9-82,6 ng/μL) și cu un grad ridicat de puritate, condiții esențiale pentru analizele ulterioare de qRT-PCR/PCR array și secvențiere.

S-au realizat întâlniri online (la fiecare șase săptămâni) între partenerii consorțiului, în cadrul cărora s-au agreat acțiunile de contracarare a potențialelor întârzieri în desfășurarea activităților cauzate de pandemia SARS-CoV2 și planul de diseminare a rezultatelor (a demarat scrierea în colaborare a articolelor științifice).

Toate activitățile prevăzute pentru această etapă au fost realizate integral.

### **Diseminare:**

- **Online workshop:** “Interventions to Reduce the Development and Transmission of AMR” September 3-4, 2020 – prezentare orală - Session 2: One Health AMR transmission – ARMIS, Heike Schmitt, Ana de Roda Husman, Edward Topp, Patrick Boerlin, Carmen Chifiriuc, Peter Kämpfer, Paul Hoeksma
- **Articol ISI în evaluare** - Antibiotic resistance profiles in cultivable microbiota isolated from some Romanian natural fishery lakes included in Natura 2000 network, Veronica Lazăr, Irina Gheorghe, Carmen Curuțiu, Ioana Savin, Florica Marinescu, Violeta Corina Cristea, Dumitru Dobre, Gabriela Loredana Popa, Mariana Carmen Chifiriuc, Mircea Ioan Popa, *BMC Veterinary Research*
- **Articol ISI în evaluare** - Insights into the impact of livestock farming manure and applied treatments on dissemination, transfer and persistence of antibiotic resistant bacteria and genes, Luminița Gabriela Măruțescu, Marcela Popa, Mihaela Jaga, Carmen Postolache, Heike Schmitt, Ana Maria de Roda Husman, Stefanie Glaeser, Patrick Boerlin, Ed Topp, GrațIELA Grădișteanu Pîrcalabioru, Mariana Carmen Chifiriuc, *International Journal of Molecular Sciences*