

RST – Raport științific și tehnic în extenso

Titlul proiectului: Selecția și diseminarea genelor de rezistență la antibiotice de la nivelul stațiilor de epurare a apelor uzate în mediul acvatic și sectorul clinic - RADAR Cod proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0114

**Etapa IV Studii moleculare și epidemiologice privind rezistomul clinic și de mediu
31.12.2020-30.12.2021**

Obiective / Activități etapa 2021

Descrierea științifică și tehnică, evidențierea rezultatelor obținute

A 4.1 Studii de epidemiologie moleculară a rezistenței la antibiotice (secvențierea genelor de rezistență la antibiotice, secvențierea transpozoniilor și a plasmidelor etc.)

A 4.2 Analiza metagenomică a unor probe de mediu selectate pe baza rezultatelor anterioare

A 4.3 Managementul proiectului

REZUMATUL ETAPEI A IV-A

În cadrul acestei etape au continuat studii de epidemiologie moleculară a rezistenței la antibiotice, care au implicat secvențierea tulpinilor izolate în etapele anterioare ale proiectului pentru analiza genelor de rezistență la antibiotice, a subtipurilor tulpinilor rezistente, secvențierea transpozoniilor și a plasmidelor și analiza metagenomică a probelor de apă. În perioada raportată au fost secvențiate 164 de tulpini bacteriene din grupul ESKAPE (52 tulpini de *Acinetobacter baumannii*, 49 *Enterococcus faecium*, 33 *Klebsiella pneumoniae*, 22 *Escherichia coli*, 7 *Enterococcus cloacae* și 1 tulpină de *Cronobacter* sp.), provenite din infecții intraspitalicești, rețeaua de apă uzată și de suprafață din diverse regiuni geografice ale țării (nord-est, sud și centru-vest) (secvențiator MiSeq Illumina, platforma MinION, Oxford Nanopore). Datele brute obținute au fost supuse analizei bioinformatică, pentru identificarea/confirmarea speciei, identificarea clonelor circulante pe baza profilului alelic a 7 gene constitutive, pentru predicția genelor care codifică repliconi plasmidiali, predicția genelor de rezistență la antibiotice, determinarea subtipurilor din fiecare specie pentru analize filogenetice și predicția profilului variațional pentru fiecare clonă/subtip specific.

Diversitatea subtipurilor identificate au variat în funcție de specie, cele mai multe subtipuri fiind identificate la tulpinile de *K. pneumoniae* (15 ST, cele mai frecvente fiind ST 258 și 101) și *A. baumannii* (14 ST, dintre care 4 subtipuri necunoscute, cele mai frecvente fiind ST 2 și 492). În cazul tulpinilor de *E. faecium*, majoritatea tulpinilor au aparținut ST 117, 80 și 203.

La cele 164 de tulpini secvențiate au fost identificate 272 de gene unice de rezistență, iar subtipurile cu numărul cel mai ridicat de gene de rezistență au fost: *A. baumannii* ST2, *E. cloacae* ST526, *E. coli* ST536, *E. faecium* ST80 și *K. pneumoniae* ST258.

Distribuția subtipurilor speciilor bacteriene, cât și a genelor de rezistență la antibiotice a variat în funcție de sursa de izolare și regiunea geografică (e.g., tulpinile de *A. baumannii* ST2 și cele de *K. pneumoniae* ST 101 și ST 258 au prezentat cea mai largă distribuție, fiind prezente atât în clinică, cât și în probele de apă uzată).

Secvențierea plasmidelor a evidențiat o diversitate redusă la tulpinile de *A. baumannii*, la care au fost evidențiate plasmide de tip pACICU-like, ce conține gena de rezistență la aminoglicozide aph(3')-VIa în structura unui transpozon TnAphA6 și de tip pMAL-like, purtătoare a genei de rezistență la carbapeneme blaOXA-72. La aceste tulpini au fost identificați integroni de clasă 1, ce conțin genele de rezistență aac(3)-Ia, aadA1 (rezistență la aminoglicozide) și sull1 (rezistență la sulfonamide) și transpozoni de diferite tipuri, respectiv: Tn2006, ce conține gena de rezistență la carbapeneme blaOXA-23, Tn6020, ce conține gena aph(3')-Ia, Tn9-like ce conține gena catA1, gena sull1 flancată de doi transpozoni Tn6292, Tn6205 ce conține genele aph(3')-Ib, aph(6)-Id și tet(B), precum și regiuni constituite din mai mulți transpozoni și gene de rezistență la antibiotice (blaTEM-84, catA1, tet(A), sull1)

La tulpinile de *E. coli* au fost identificate plasmide de diferite dimensiuni: plasmide mari de tip multireplicon (IncFII și IncFIB) ce conțin multiple gene de rezistență la antibiotice, în unele cazuri flancate de transpozoni, precum și un integron de clasă 1, plasmide de dimensiuni mai mici ce conțin gena blaOXA-48 într-o structură de tip IS1R – ΔIS10A – blaOXA-48 – IS10A, plasmide

– IncII-I(Alpha), IncR, 7, Col(BS512) și netipabile. Plasmida IncFII prezintă gena blaOXA-48, flancată de un element IS26. Plasmida IncR cuprinde Tn5403 în care se află inserată gena blaTEM-1. Chiar în absența plasmidelor, una dintre tulpinile de *E. coli* a prezentat o regiune de multirezistență, conținând genele de rezistență blaTEM-1, aac(3)-IId, mph(A) flancate de multiple inserții ale IS26, genele aadA5, sull1, dfrA17 în structura unui integron de clasă 1, precum și gena blaOXA-48, flancată de IS1R și IS10A.

Analiza metagenomică a demarat pentru 102 probe de apă, 49 probe de ape uzate provenite din zona București (stație epurare spital și stație epurare orașenească), 48 din zona Iași (stație epurare spital și stație epurare orașenească) și 5 probe de apă din medii naturale. Pentru extracția ADN bacterian s-a utilizat kit-ul DNeasy PowerWater (Qiagen), iar compoziția bacteriană s-a stabilit pe baza analizei genei ARNr 16S (kitul Ion 16S Metagenomics și platforma Ion Torrent

PGM, Thermo Fisher Scientific). Analiza compoziției bacteriene a probelor de apă din medii naturale a evidențiat un număr de 108- 203 familii, 145 – 379 genuri și 217 – 448 de specii la probele de apă din medii naturale și respectiv 43-235 familii, 61-264genuri și 97-385 specii la probele de ape uzate analizate până în prezent.

În probele analizate au fost evidențiați taxoni cu semnificație clinică (5 taxoni diferiți în probele de ape naturale și 17 în cele de ape uzate).

Analiza beta-diversității cu ajutorul indicelui de similitudine Bray Curtis a permis diferențierea clară a probelor de apă din influentul și efluentul stațiilor de epurare a apelor uzate.

În cadrul acestei etape, au fost publicate 6 articole ISI, în reviste Q1/Q2, 12 capitole de carte la o editură internațională, 1 cerere de brevet, au fost prezentate 3 comunicări orale și 3 postere la conferințe naționale și internaționale, iar la obținerea rezultatelor au fost implicați 10 studenți care și-au realizat partea experimentală a lucrărilor de licență și tezele de masterat în cadrul proiectului.

Toate activitățile și indicatorii prevăzuți pentru această etapă au fost îndepliniți.

A 4.3 Managementul proiectului

În cadrul acestei etape, au fost publicate 6 articole ISI, în reviste Q1/Q2, 1 capitol de carte la o editură internațională, 1 cerere de brevet, au fost prezentate 3 comunicări orale și 3 postere la conferințe naționale și internaționale, iar la obținerea rezultatelor au fost implicați 10 studenți care și-au realizat partea experimentală a lucrărilor de licență și tezele de masterat în cadrul proiectului.

Articole ISI:

1. Gheorghe I, Barbu IC, Surleac M, Sârbu I, Popa LI, Paraschiv S, Feng Y, Lazăr V, Chifiriuc MC, Oțelea D, Zhiyong Z. Subtypes, resistance and virulence platforms in extended-drug resistant *Acinetobacter baumannii* Romanian isolates. *Sci Rep.* 2021 Jun 24;11(1):13288. doi: 10.1038/s41598-021-92590-5.
2. Popa LI, Gheorghe I, Barbu IC, Surleac M, Paraschiv S, Măruțescu L, Popa M, Pîrcălăbioru GG, Talapan D, Niță M, Streinu-Cercel A, Streinu-Cercel A, Oțelea D, Chifiriuc MC. Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Clone Survival Chain From Inpatients to Hospital Effluent After Chlorine Treatment. *Front Microbiol.* 2021;11:610296. doi: 10.3389/fmicb.2020.610296.
3. Preda M, Mihai MM, Popa LI, Dițu LM, Holban AM, Manolescu LSC, Popa GL, Muntean AA, Gheorghe I, Chifiriuc CM, Popa MI. Phenotypic and genotypic virulence features of staphylococcal strains isolated from difficult-to-treat skin and soft tissue infections. *PLoS One.* 2021;16(2):e0246478. doi: 10.1371/journal.pone.0246478.
4. Grădișteanu Pîrcălăbioru G, Popa LI, Măruțescu L, Gheorghe I, Popa M, Czobor Barbu I, Cristescu R, Chifiriuc MC. Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics.* 2021;13(2):196. doi: 10.3390/pharmaceutics13020196.
5. Predoi S-A, Ciobanu CS, Motelica-Heino M, Chifiriuc MC, Badea ML, Iconaru SL. Preparation of Porous Hydroxyapatite Using Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide as Surfactant for the Removal of Lead Ions from Aquatic Solutions. *Polymers.* 2021; 13(10):1617. <https://doi.org/10.3390/polym13101617>
6. Vrâncianu CO, Dobre EG, Gheorghe I, Barbu I, Cristian RE, Chifiriuc MC. Present and Future Perspectives on Therapeutic Options for Carbapenemase-Producing Enterobacterales Infections. *Microorganisms.* 2021; 9(4):730. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040730>

Cerere de brevet național

1. Fikai D, Dolete G, Croitoru AM, Popa M, Boanță LF, Mihăiescu DE, Fikai A, Andronescu E, Chifiriuc C. Tehnologie de tartare a apelor uzate de la nivelul stațiilor de epurare cu potential ridicat de antibiotic, pesticide sau alte substanțe biologic active; A/00707/24.11.2021 OSIM

Capitol de carte

1. Moroșan A, Croitoru AM, Dolete G, Spoială A, Fikai D, Fikai A, Chifiriuc MC. Nanotechnologies - A Modern Approach against the Development of Bacterial Resistance în Importance & Applications of Nanotechnology, Austin Publishing Group. Vol. 1, Chapter 3, pp. 39-48.

Conferințe

1. Gheorghe I, Barbu I, Surleac M, Popa L, Paraschiv S, Popa M, Grădișteanu G, Măruțescu L, Talapan D, Banciu A, Stoica C, Gheorghe S, Irina L, Niță Lazăr M, Muntean A, Oțelea D, Popa MI, Chifiriuc MC. Tracking down multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital to the aquatic environment via the wastewater network, 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 9 – 12 July 2021, Online (poster)
2. Popa LI, Gheorghe I, Barbu Czobor I, Surleac M, Paraschiv S, Măruțescu L, Popa M, Pîrcălăbioru G, Talapan D, Niță M, Streinu-Cercel A, Streinu-Cercel A, Oțelea D, Muntean A, Popa MI, Dragomirescu C, Chifiriuc MC. Persistența unei clone *Klebsiella pneumoniae* ST101 multi-rezistente din mediul clinic în influentul și efluentul spitalului după Clorinare, Conferința Științifică De Primăvară A Aosr, 2021, București, 13-14 mai 2021, on-line sub genericul

„Academia Oamenilor de Știință din România –personalități, realizări, obiective”. (prezentare orală)

3. Surleac M, Chifiriuc MC. NGS for microbial AR and virulence surveillance of hospital wastewaters”, 17th edition of Scientific Days of the National Institute for Infectious Diseases “Prof. Dr. Matei Balș”, 18-21 Octombrie 2021, online (prezentare orală)

4. Pelcaru FC, Nica IC, Stan MS, Dinischiotu A, Risk assessment study on *Carassius gibelio* fish collected from water bodies from Bucharest”, The 9th World Sustainability Forum, 13–15 September 2021, Online. (poster)

5. Banciu AR, Gheorghe Ș, Stoica C, Lucaciu IE, Niță-Lazăr M, Post-Pandemic Effects On Faecal Pollution Of Aquatic Systems, 24 Th International Symposium “The Environment And The Industry”, 24.09.2021 București (poster)

6. Popa L, Surleac M, Muntean A, Dragomirescu C, Popa MI, Chifiriuc C, Aspecte privind epidemiologia moleculară a rezistenței la antibiotice beta-lactamice de ultimă generație în mediul clinic și acvatic, Institutul „Cantacuzino”, 100 de ani în slujba sănătății, 25-27 noiembrie 2021, online (prezentare orală)

Altele

1. Stan M-R., Stan MS. Toxicitatea poluanților din apele uzate la nivelul populațiilor de *Carassius auratus gibelio*, (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2020

2. Proca MT, Stan MS Analiza modificărilor biochimice la peștii recoltați din lacuri de agrement din București, (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

3. Radu OD, Dinischiotu A, Evaluarea stresului oxidativ indus de poluanții apelor de suprafață în branhiile peștilor expuși (Teză licență – specializarea Biochimie), iunie 2021

4. Bugeanu M I, Stan MS Evaluarea stresului oxidativ la nivelul branhiilor peștilor din diferite lacuri din București (Teză disertație -Master Biochimie și Biologie Moleculară), iunie 2021

5. Voicu AM, Popa LI, Gheorghe I, Profiluri de antibioretistență ale unor tulpini de *Acinetobacter baumannii* izolate din clinică și din stații de epurare orășenești din sudul țării (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

6. Putinică LM, Popa LI, Gheorghe I Studiul markerilor fenotipici și moleculari de rezistență la antibiotice la tulpini de *Enterobacteriaceae* izolate dintr-o stație de epurare orășenească (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

7. Stana TM, Gheorghe I, Antibiotipuri la tulpini de bacili Gram negativi fermentativi izolate din stații de epurare orășenești (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

8. Țup MF, Vrânceanu O, Gheorghe I, Profiluri de antibioretistență ale unor tulpini de *Acinetobacter baumannii* izolate din clinică și din stații de epurare orășenești din nordul țării (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

9. Timofte C, Măruțescu L, Determinarea cantitativă de bacterii rezistente la antibiotice din probe de apă uzată (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021

10. Pîndaru AM, Măruțescu L, Evaluarea in vitro a caracterelor de patogenitate și virulență la tulpini microbiene de *Escherichia coli* producătoare de beta-lactamaze izolate din probe de apă uzată și ape de suprafață (Teză licență – specializarea Biologie), iunie 2021