

**PROIECT PN-III-P4-ID-PCCF2016-011  
CONTRACT NR. 10/02/2018**

**Denumirea proiectului: *Selecția și diseminarea genelor de rezistență la antibiotice de la nivelul stațiilor de epurare a apelor uzate în mediul acvatic și sectorul clinic***

**RAPORT ȘTIINȚIFIC DE ETAPĂ  
PERIOADA RAPORTATĂ  
02/07/2018 - 28/12/2018**

**Rezumatul etapei**

În cadrul acestei etape au fost optimizate protocoalele de lucru și au fost redactate procedurile operatorii standard care vor fi utilizate în etapele următoare. Procedurile optimizate au fost aplicate pentru realizarea studiului pilot de la nivelul unei unități spitalicești și al stației de tratare a acesteia.

În cadrul studiului pilot au fost analizate probe clinice (CO, P2) și un număr de patru probe de apă uzată provenite de la o unitate spitalicească din București, respectiv 2 probe de influent și 2 de efluent recoltate înainte și respectiv la câteva ore după dezinfecția prin clorinare (P1, P2). Analiza probelor de apă uzată a inclus determinarea unor parametri clasici microbiologici, respectiv bacterii coliforme totale, bacterii coliforme fecale, enterococi (streptococi fecali) și fizico-chimici: pH, materii în suspensie, CCOCr, CBO<sub>5</sub>, detergenți, utilizând metode standardizate (P1), cât și analiza diferitelor categorii de poluanți (pesticide, metale grele, antibiotice) prin 3 metode instrumentale distincte (ICP-MS, GC-MS/MS și HPLC-MS/MS), optimizate în cadrul primei etape a proiectului (P3).

De asemenea, probele de apă uzată diluate în prealabil și concentrate prin filtrare au fost analizate pentru detecția de bacterii rezistente la antibiotice din grupul ESKAPE, prin metode dependente de cultivare, utilizând medii de cultură cromogene selective: ChromID ESBL agar, ChromID OXA-48, ChromID CARBA, ChromID VRE and ChromID MRSA (CO, P4).

Cele patru probe analizate, recoltate în interval de 2 zile, înainte și după clorinare, au fost relativ similare în ceea ce privește parametrii standard microbiologici și fizico-chimici. De asemenea, din toate cele 4 probe au fost izolate tulpini de *Enterobacteriaceae* cu fenotipuri de rezistență BLSE (beta-lactamaze de spectru larg) și CPE (carbapenemaze) și respectiv, de enterococi cu fenotip de rezistență la vancomicină (VRE). Analizele cantitative privind prevalența fenotipurilor de rezistență nu au relevat diferențe semnificative între probele de apă uzată analizate. De asemenea, studiul pilot a demonstrat necesitatea ajustării diluțiilor de probe de apă uzate recoltate de la stațiile de epurare ale unităților spitalicești, pentru a putea realiza cuantificarea bacteriilor Gram-negative producătoare de carbapenemaze.

În cadrul studiului pilot, au fost prelevate de pe membranele filtrante cultivate pe mediile de cultură cromogene suplimentate cu antibiotice un număr de 235 de izolate, care au prezentat fenotipuri caracteristice pentru: *E. coli* BLSE(40 tulpini), KESC BLSE (29), bacili Gram negativi non fermentativi (BGNF) BLSE (15), BG cu fenotip CPE (*E. coli* OXA-48– 7 tulpini; KESC OXA-48– 40; *E. coli* CARBA– 1, KESC CARBA – 39 și BGNF CARBA– 36 de tulpini) și enterococi cu fenotip VRE (25 tulpini) pentru identificare la nivel de specie.

Analiza MALDI-TOF MS (P4) a pus în evidență prezența următoarelor specii bacteriene țintă: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *P. aeruginosa*, *P. otitidis*, *E. faecium*, *S. epidermidis* și *S. aureus*. Mediile de cultură cromogene au prezentat o specificitate

de detecție a organismelor țintă cu diferite fenotipuri de rezistență de: 100% pentru *E. coli* BLSE (40/40), VRE (25/25), *E. coli* CARBA (1/1), 97.93% pentru KESC BLSE, 94.87% pentru KESC CARBA (37/39), 94.44% pentru NF CARBA (34/36), și 6.66% pentru NF BLSE.

Pentru identificarea suportului molecular al rezistenței la antibiotice  $\beta$ -lactamice, quinolone, glicopeptide și macrolide prin PCR (CO, P4) au fost utilizate lizate din masa celulară bacteriană dezvoltată pe suprafața filtrelor corespunzătoare celui mai mare volum filtrat pentru fiecare tip de mediu cromogen utilizat sau din cultura bacteriană pură (în cazul tulpinilor clinice). A fost investigată prezența genelor pentru carbapenemazele dobândite din clasa B, cel mai frecvent raportate la nivel global pentru patogenii ESKAPE (NDM, KPC, VIM, IMP) aparținând speciilor *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P.aeruginosa* și *Enterobacter* sp., dar și a carbapenemazelor din clasa D de beta-lactamaze (OXA-48 specifică enterobacteriilor și OXA-23, OXA-24, OXA-58 specifice bacililor BGNF. Suplimentar a fost investigată și prezența carbapenemazei OXA-51 intrinsecă la *A. baumannii*. *Screening*-ul genotipic s-a realizat și pe cele 16 tulpini clinice rezistente, izolate utilizând aceleași medii de izolare, din probe clinice (uroculturi, secreții de tract respirator, secreții de plagă, cateter, sondă traheală) recoltate în unitatea spitalicească selectată pentru studiul pilot în același interval temporal.

*Screening*-ul genotipic a demonstrat prezența genelor codificatoare pentru  $\beta$ -lactamazele de spectru extins (BLSE: *bla*<sub>CTX-M</sub> și *bla*<sub>TEM</sub>), a metalo-beta-lactamazelor *bla*KPC, *bla*NDM, a carbapenemazelor de clasă de *bla*OXA-23, *bla*OXA-24, *bla*OXA-51 și *bla*OXA-58, a genelor de rezistență la quinolone *qnrA*, B, S în masa celulară aferentă tuturor filtrelor analizate. Gena *mecA* a fost identificată doar în proba de efluent recoltată înainte de clorinare. Rezistența la vancomicină evidențiată prin prezența genei VanA a fost confirmată în toate probele analizate; VanB în cazul probelor provenite din efluent înainte și după clorinare. Rezistența la macrolide a fost evidențiată prin prezența genei *ermA* la trei din cele patru probe provenite din efluent înainte și după clorinare, respectiv influent înainte de clorinare. Pentru tulpinile clinice izolate în aceeași secvență temporală, au fost evidențiați markeri genetici detectați în probele de apă uzată cu excepția genelor VanC și *bla*<sub>SHV</sub> prezente exclusiv la izolatele clinice. La tulpinile clinice nu au fost detectate genele de rezistență la carbapeneme *bla*KPC, *bla*OXA-23, *bla*OXA-58),  $\beta$ -lactamice de spectru larg (*bla*TEM), macrolide (*ermA/B/C*) și quinolone (*qnrA/S*).

În ceea ce privește analiza prezenței pesticidelor (P3) în probele de apă uzată, conținutul acestora a fost sub limita de detecție a metodei (pentru mixul de pesticide utilizat). În schimb, în cazul analizei elementale prin ICPMS (P3) a fost evidențiate prezența unor elemente cu toxicitate ridicată: Cr total, Ni, As, Pb. În cazul antibioticelor, a fost evidențiată prezența antibioticelor: clindamicina, tetraciclină, eritromicina și vancomicină (CO, P3). Nu a fost evidențiată prezența meropenemului, trimetoprimului, sulfametoxazolului, colistinului sau a imipenemului.

Rezultatele obținute în cadrul studiului pilot indică necesitatea extinderii gamei de pesticide, în special prin includerea unor pesticide persistente. Se impun măsurători suplimentare ale conținutului de compuși biologic activi (antibiotice, pesticide, metale grele) și din nămol pentru a explica conținutul relativ egal de antibiotice/metale grele în cazul influentului comparativ cu efluentul. Corelarea rezultatelor privind nivelul de metale grele, pesticide sau antibiotice în probele de apă uzată, de suprafață și de nămol este absolut necesară pentru optimizarea protocolului de monitorizare a acestor contaminanți în pești.

## Obiectivul fazei I. Elaborarea procedurilor operatorii standard (POS) și realizarea studiului pilot

### Activitățile 1.1.-1.14. Elaborarea procedurilor operatorii standard (POS)

În cadrul acestei etape au fost optimizate protocoalele de lucru (altele decât metodele standard utilizate în laboratorul clinic și în laboratorul de control al apei), prevăzute la **Activitățile 1.1-1.14.** și au fost redactate procedurile operatorii standard care vor fi utilizate în etapele următoare. Fluxul de lucru privind analiza microbiologică a probelor este sumarizat în figurile 1-3.

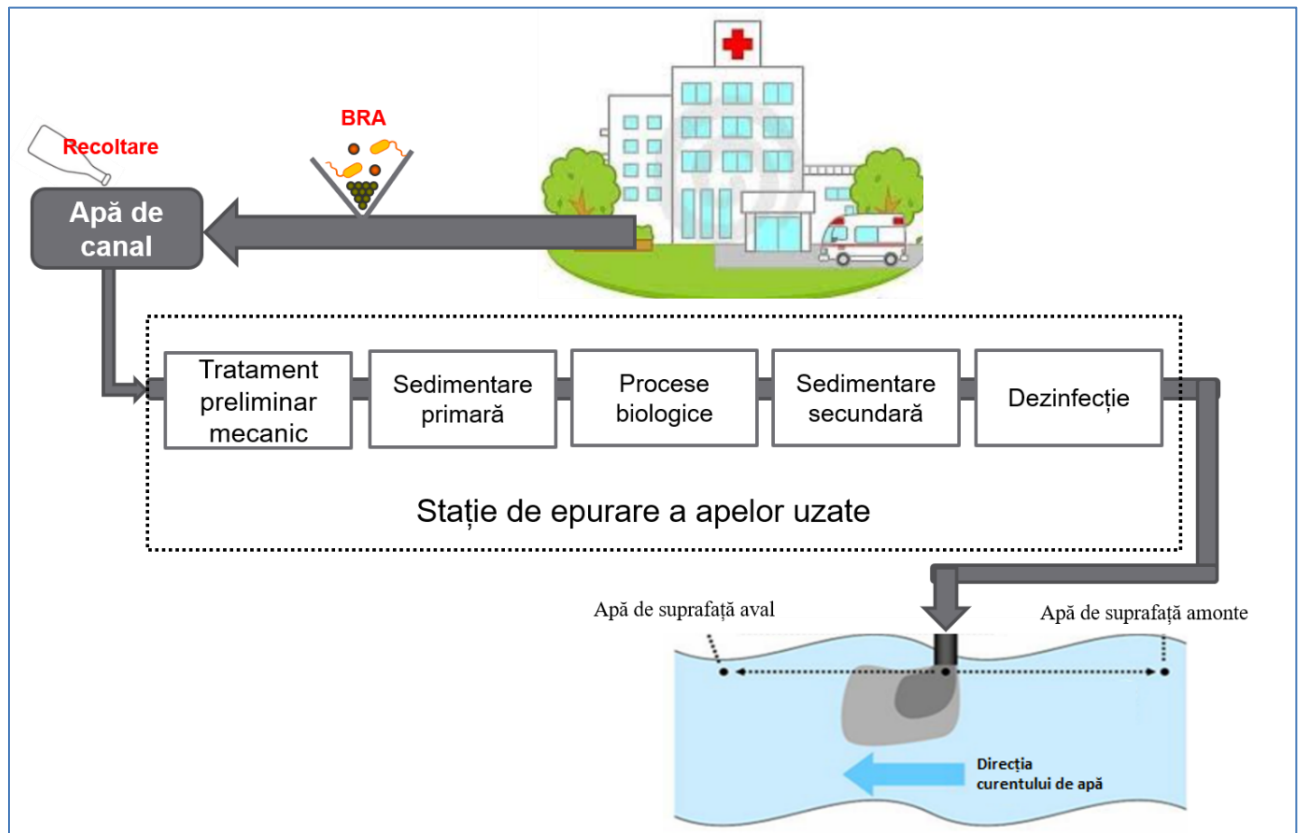


Figura 1. Schematizarea procesului de recoltare a probelor.

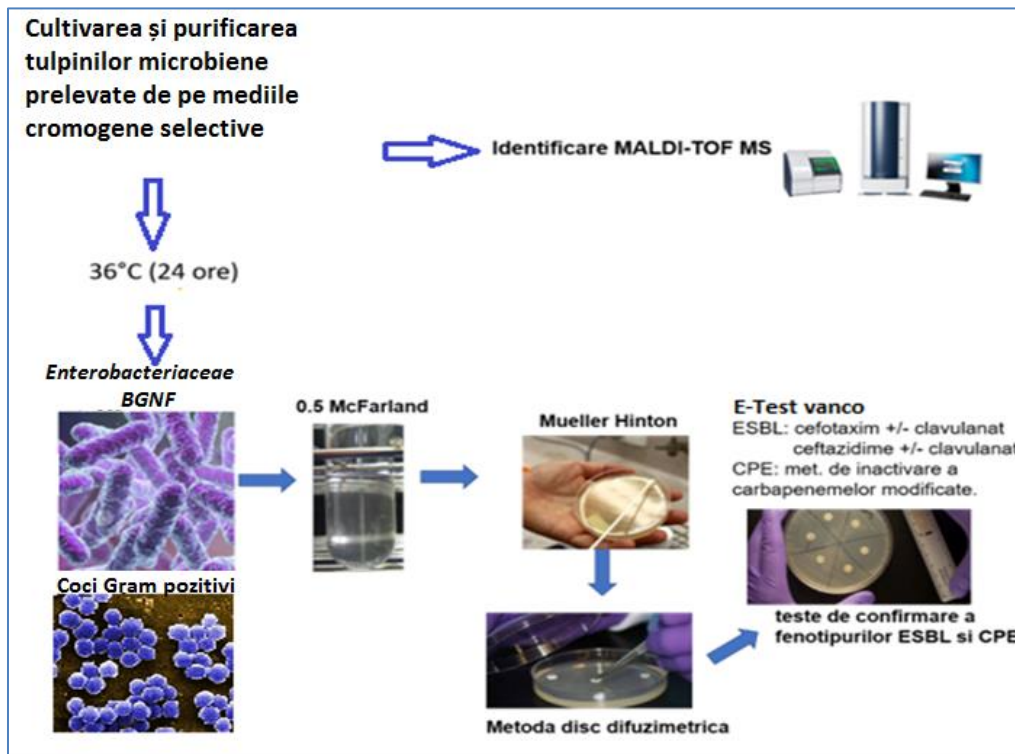
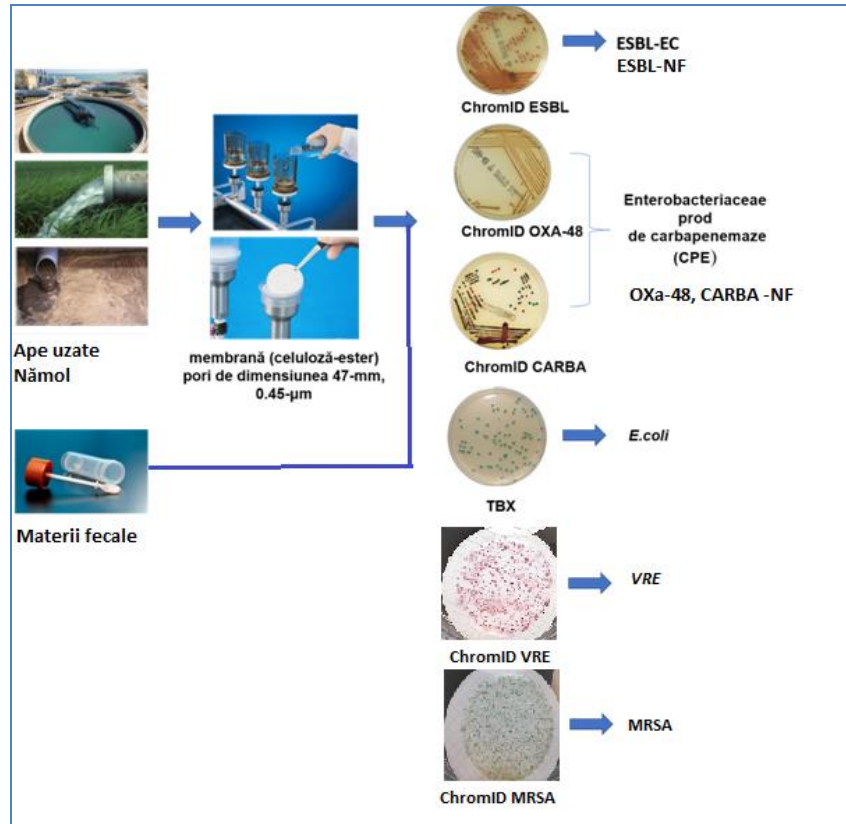
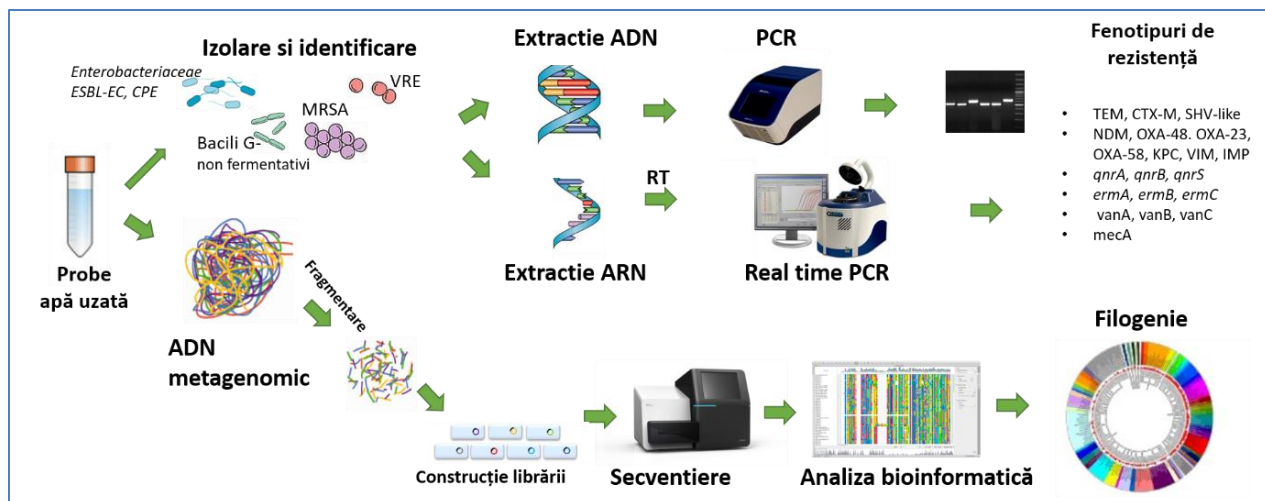


Figura 2. Confirmarea fenotipică a speciei și a fenotipurilor de rezistență de interes.



**Figura 3. Detecția genelor de rezistență la antibiotice.**

În cadrul acestei etape au fost optimizate protocoalele de analiză a metalelor grele, pesticidelor și antibioticelor prin 3 metode instrumentale distincte: ICP-MS, GC-MS/MS și HPLC-MS/MS, cu respectarea cerințelor specifice analizelor de reziduuri, precum și a utilizării unor metode specifice de concentrare / purificare a probei. Principalele probleme referitoare la pregătirea probei sunt legate de complexitatea matricii și potențialii compuși interferenți, contaminarea microbiologică ridicată și prezența particulelor în suspensie, acestea fiind abordate în mod diferit prin cele 3 metode: i) pentru metoda ICP-MS, se apelează la digestia acidă a probei omogenizate în prealabil, fapt ce conduce la obținerea unei soluții apoase, ce poate fi analizată direct după diluarea corespunzătoare; ii) în metoda GC-MS/MS se utilizează extracția lichid-lichid cu clorură de metilen, urmată de filtrare prin filter cu pori de 0.45μm, concentrare și analiză; iii) pentru metoda HPLC-MS/MS, se utilizează extracția în fază solidă cu material mezoporos de tip MCM41, urmată de desorbția compușilor de interes cu metanol / acetonitril. Din punct de vedere instrumental, utilizarea tehnicii MS/MS cuplate cu cromatografia de gaze sau lichide, permite eliminarea interferențelor de matrice prin alegerea adecvată a ionilor precursori, a condițiilor de activare colizională, precum și a ionilor specifici pentru cuantificare și validare. De asemenea, elementele de validare privind prelevarea, pregătirea probei și analiza propriu-zisă, sunt etape esențiale pentru obținerea unor rezultate cantitative robuste.

Fluxul de lucru privind analiza poluanților în probele de apă uzată și nămol este sumarizat în figurile 4-5.

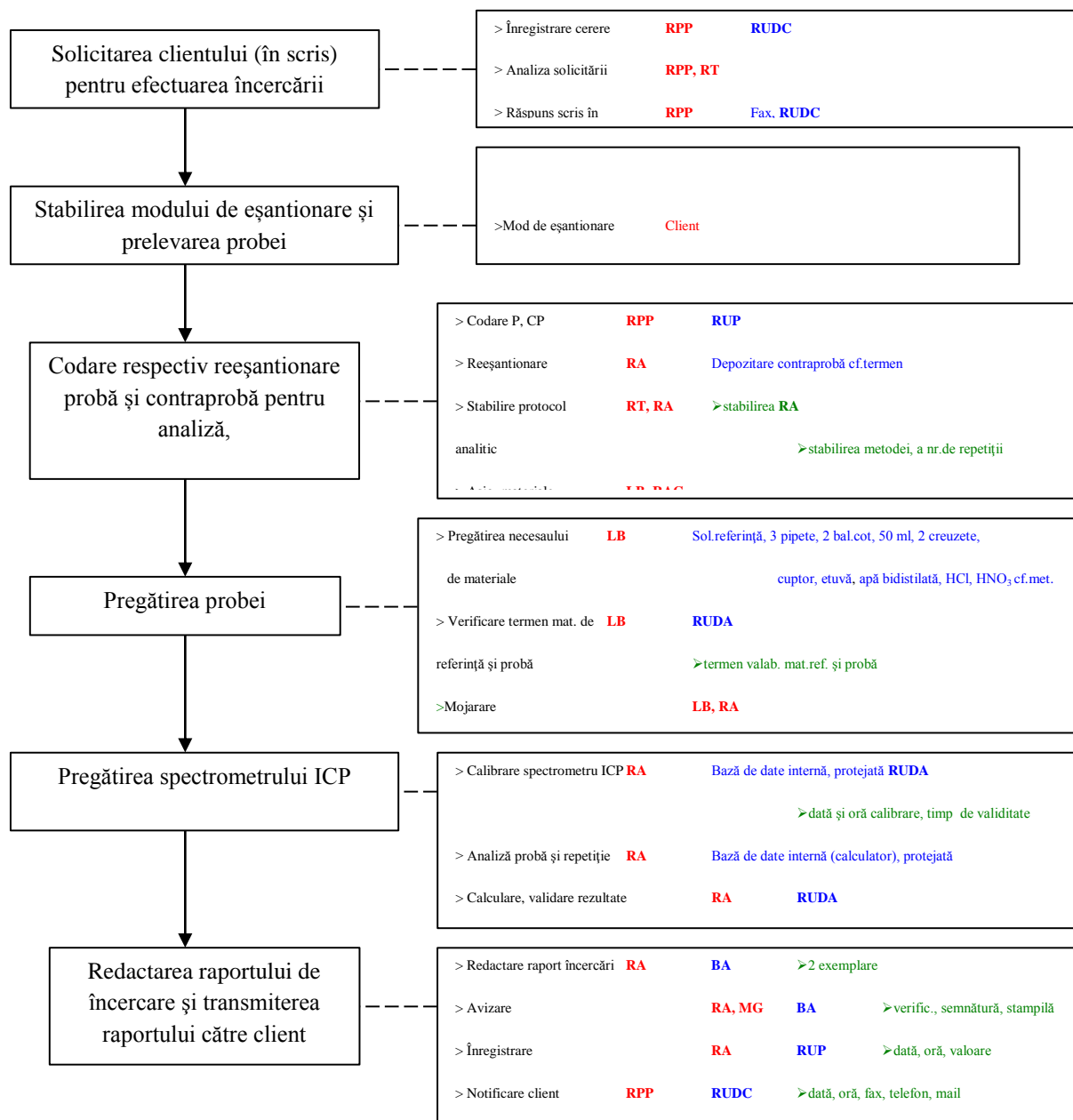
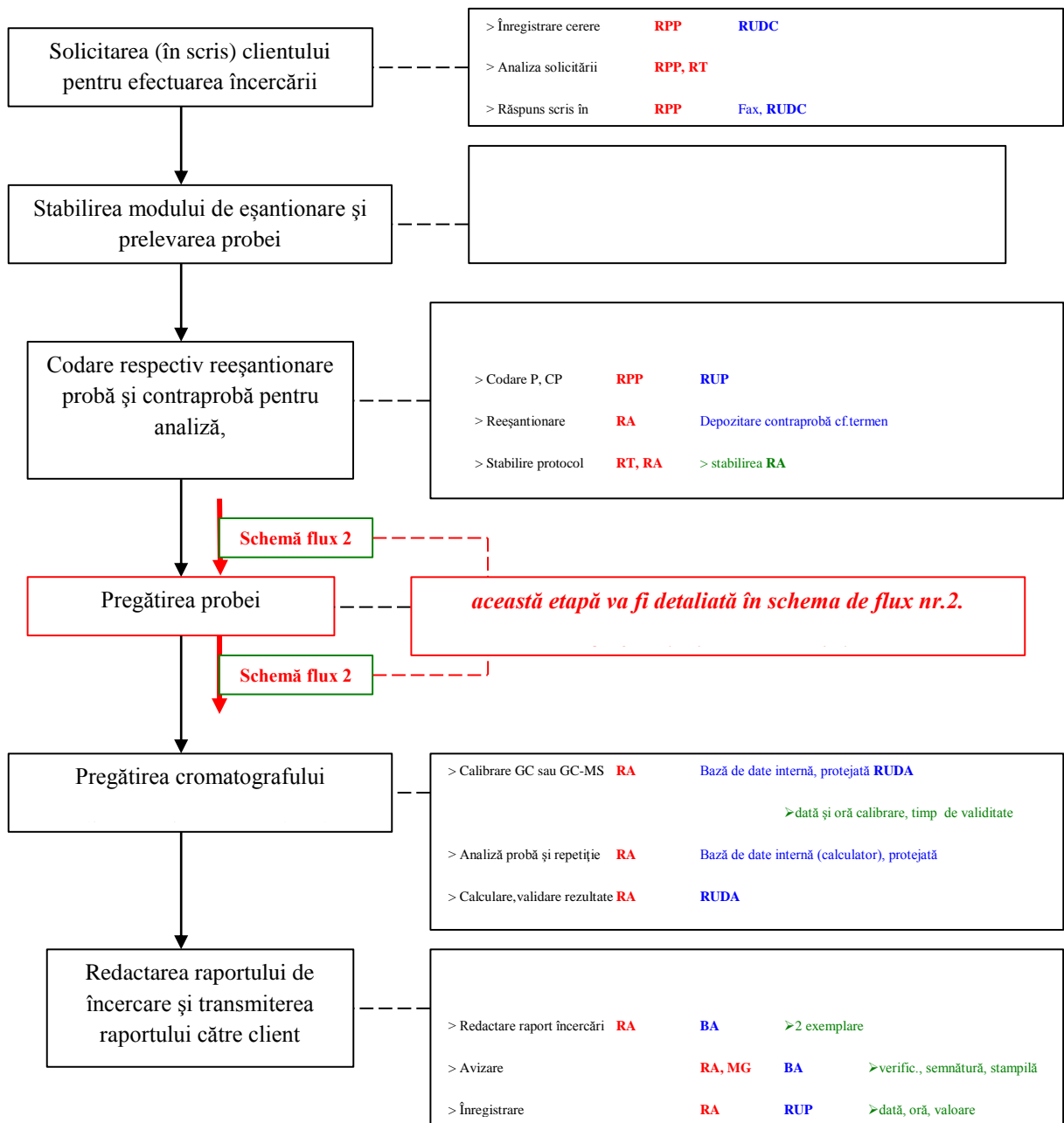
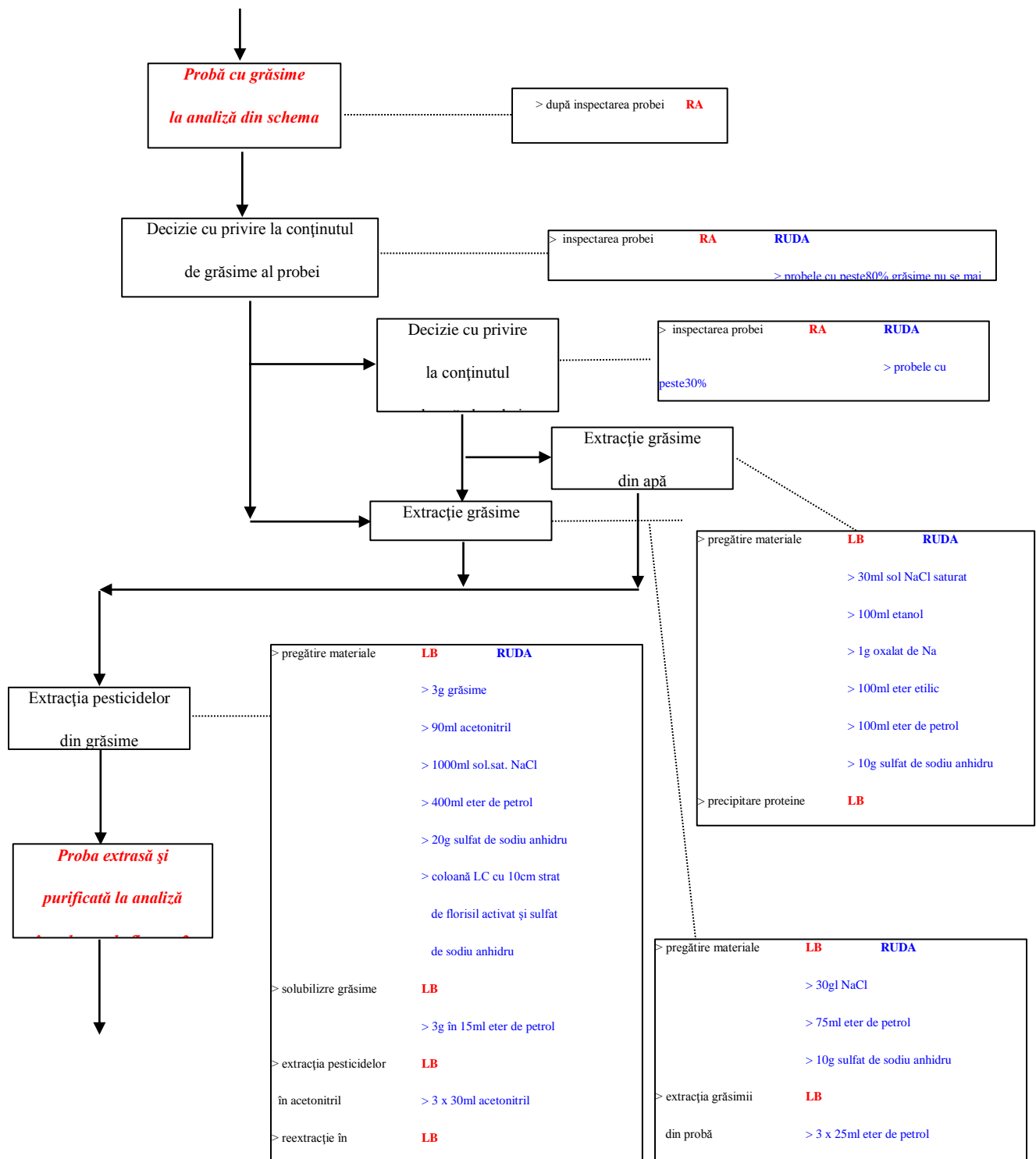


Figura 4. Schema de flux pentru executarea unei încercări ICP-MS/MS (detectarea metalelor grele).





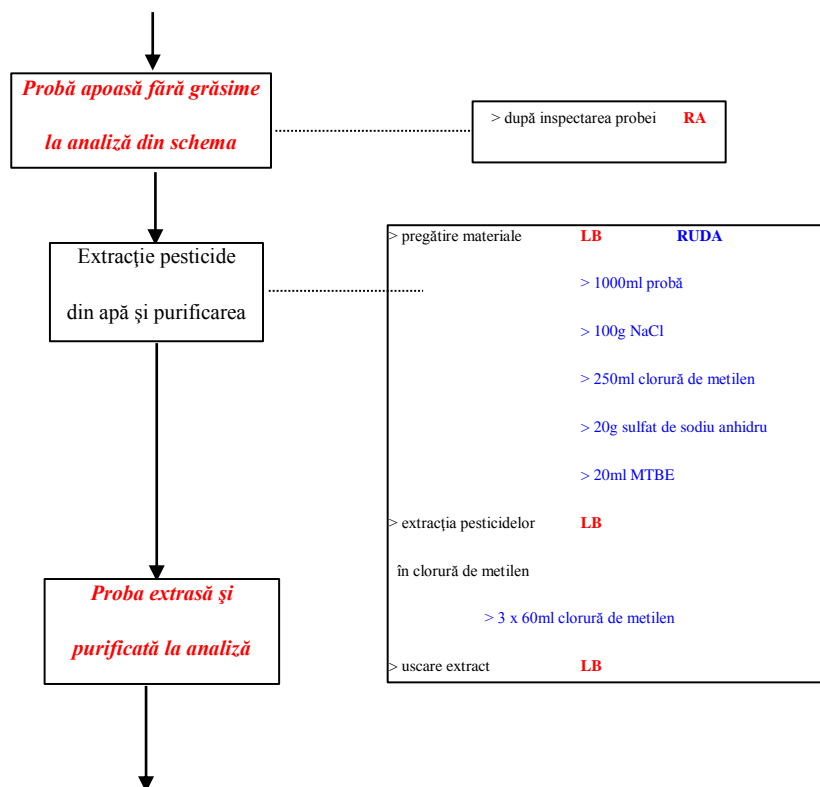


Figura 5. Schema de flux pentru executarea unei încercări GC-MS/MS (pentru detectarea pesticidelor).

Pentru analiza prezenței antibioticelor prin HPLC-MS/MS, a fost utilizată o metodă de extracție ce implică o concentrare a acestora prin adsorbție selectivă pe suport mezoporos de tip MCM41 (40ml probă și 100mg adsorbant), urmată de 2 spălări și centrifugări succesive. Extracția antibioticelor s-a realizat în metanol, o extracție finală cu acetonitril fiind folosită pentru evaluarea unor eventuale probleme de partiție a compușilor între adsorbent și metanol. Rezultatele sunt exprimate în  $\mu\text{g/litru}$ . În cazul în care a fost realizată validarea și calculul de incertitudine, valoarea rezultatului va fi urmată de valoarea incertitudinii extinse.

Pentru studiul stabilității antibioticelor ceftazidim și imipenem (CO) s-a utilizat un sistem cromatografic compus din pompă cuaternară; autosampler; degazor on-line; sisteme independente pentru termostatarea coloanei și a compartimentelor de probă; detector DAD și detector de fluorescență (FLD).

**Condiții cromatografice :** coloană cromatografică : HypersilGold; faza staționară: C18; lungimea coloanei: 250 mm; dimensiunea particulelor: 5  $\mu\text{m}$ ; temperatura coloanei: 25°C; temperatura compartimentului de probe : 25°C;

**Pentru ceftazidim**

**Faza mobilă :** solvent A: metanol; solvent B: apă, 70/30 (v/v),

**Eluție :** izocratică

**Debit:** 1 mL.min<sup>-1</sup>.

**Volum de injecție:** 10  $\mu$ L.

**Detectie :** DAD la 245 nm;

**Timp de înregistrare a cromatogramei:** max 40 min.

**Soluție stoc:** 12 discuri de ceftazidină dizolvate în 10 mL apă ultrapură

**Soluții de lucru:** diluții succesive în fază mobilă

Soluții de probă: apa pentru analiză a fost filtrată prin filtre de 45  $\mu$ m și apoi injectată direct în sistemul cromatografic.

**Pentru imipenem**

**Faza mobilă :** solvent A: apă ( $H_3PO_4$  0,1%) ; solvent B: apă, 40/60 (v/v),

**Eluție :** izocratică

**Debit:** 0.8 mL.min<sup>-1</sup>.

**Volum de injecție:** 10  $\mu$ L.

**Detectie :** DAD la 300 nm;

**Timp de înregistrare a cromatogramei:** max 40 min.

**Soluție stoc:** 0,040 g de imipenem dizolvate în 10 mL apă ultrapură

**Soluții de lucru:** diluții succesive în fază mobilă

Soluții de probă: apa pentru analiză a fost filtrată prin filtre de 45  $\mu$ m și apoi injectată direct în sistemul cromatografic.

### **Activitatea 1.15. Realizarea studiului pilot la nivelul unei unități spitalicești și al unei stații de tratare a apelor uzate**

Procedurile optimizate în cadrul activităților anterioare au fost aplicate pentru realizarea studiului pilot de la nivelul unei unități spitalicești și al stației de tratare a acestora.

În cadrul studiului pilot au fost analizate un număr de patru probe de apă uzată provenite de la o unitate spitalicească din București, respectiv o probă de influent și una de efluent înainte de dezinfecție prin clorinare și respectiv o probă de influent și una de efluent după dezinfecție prin clorinare. Probele de apă uzată (1,5 L) au fost prelevate de P1 și transportate pe gheață, în aceeași zi, la laborator unde au fost păstrate la  $5 \pm 3$  ° C până la analiză (maxim 24 de ore). Probele au fost codificate cu un număr unic de identificare.

Analiza probelor de apă uzată a inclus determinarea unor parametri clasici microbiologici, respectiv bacterii coliforme totale, bacterii coliforme fecale, enterococi (streptococi fecali) și fizico- chimici: pH, materii în suspensie, CCOCr, CBO<sub>5</sub>, detergenți, utilizând metode standardizate (P1). Rezultatele analizelor celor patru probe de apă sunt prezentate în **Tabelele 1 și 2**.

**Tabelul 1. Rezultatele analizelor microbiologice și fizico-chimice pentru probele de apă uzată: influent și una de efluent înainte de dezinfecție prin clorinare**

Data recepției în laborator	PARAMETRI ANALIZAȚI	U.M.	Cod probă/ Rezultate analiză
21.11.2018			<b>RA18002 (influent)</b>
	Bacterii coliforme totale	UFC/100cm <sup>3</sup>	1×10 <sup>8</sup>
	Bacterii coliforme fecale	UFC/100cm <sup>4</sup>	113×10 <sup>6</sup>
	Enterococi (Streptococi fecali)	UFC/100cm <sup>5</sup>	4×10 <sup>6</sup>
	<i>Salmonella spp.</i>	-	Absent
	pH măsurat la temp. de 20,1°C	unități pH	6,7
	Materii în suspensie	mg/l	128
	CCOCr	mgO <sub>2</sub> /l	470,4
	CBO <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /l	178,9
	Reziduu filtrabil la 105°C	mg/l	492

	Detergenți biodegradabili: -agenți de suprafață anionici	mg/l	1,29
	-agenți de suprafață neionici	mg/l	1,08
			<b>RA18001 (efluent)</b>
21.11.2018	Bacterii coliforme totale	UFC/100cm <sup>3</sup>	127×10 <sup>5</sup>
	Bacterii coliforme fecale	UFC/100cm <sup>4</sup>	9×10 <sup>6</sup>
	Enterococi (Streptococi fecali)	UFC/100cm <sup>5</sup>	25×10 <sup>5</sup>
	<i>Salmonella spp.</i>	-	Absent
	pH măsurat la temp. de 20,1°C	unități pH	6,7
	Materii în suspensie	mg/l	106
	CCOCr	mgO <sub>2</sub> /l	364,8
	CBO <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /l	161,3
	Reziduu filtrabil la 105°C	mg/l	476
	Detergenți biodegradabili: -agenți de suprafață anionici	mg/l	1,22
	-agenți de suprafață neionici	mg/l	0,98

**Tabelul2. Rezultatele analizelor microbiologice și fizico-chimice pentru probele de apă uzată:  
influent și una de efluent după dezinfecție prin clorinare**

Data recepție probe	PARAMETRIANALIZAȚI	U.M.	Cod probă/ Rezultate
23.11.2018			<b>RA18003 (influent)</b>
	Bacterii coliforme totale	UFC/100cm <sup>3</sup>	26×10 <sup>6</sup>
	Bacterii coliforme fecale	UFC/100cm <sup>4</sup>	18×10 <sup>6</sup>
	Enterococi (Streptococi fecali)	UFC/100cm <sup>5</sup>	3×10 <sup>6</sup>
	<i>Salmonella spp.</i>	-	Absent
	pH măsurat la temp. de 19,7°C	unități pH	7,0
	Materii în suspensie	mg/l	73
	CCOCr	mgO <sub>2</sub> /l	384
	CBO <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /l	142,9
	Reziduu filtrabil la 105°C	mg/l	536
	Detergenți biodegradabili: -agenți de suprafață anionici	mg/l	1,10
	-agenți de suprafață neionici	mg/l	0,83
23.11.2018			<b>RA18004(efluent)</b>
	Bacterii coliforme totale	UFC/100cm <sup>3</sup>	13×10 <sup>6</sup>
	Bacterii coliforme fecale	UFC/100cm <sup>4</sup>	98×10 <sup>5</sup>
	Enterococi (Streptococi fecali)	UFC/100cm <sup>5</sup>	3×10 <sup>6</sup>
	<i>Salmonella spp.</i>	-	Absent
	pH măsurat la temp. de 19,8°C	unități pH	6,3
	Materii în suspensie	mg/l	3820
	CCOCr	mgO <sub>2</sub> /l	5400
	CBO <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /l	2110
	Reziduu filtrabil la 105°C	mg/l	640
	Detergenți biodegradabili: -agenți de suprafață anionici	mg/l	0,72
	-agenți de suprafață neionici	mg/l	0,60

De asemenea, probele de apă uzată au fost analizate pentru detecția de bacterii rezistente la antibiotice prin metode dependente de cultivare bazate pe metoda membranei filtrante (**CO, P2,P4**). Volume și diluții zecimale adecvate de probă de apă uzată (influent, efluent) au fost filtrate conform tabelului nr. 3, prin filtre Millipore cu pori de dimensiunea 0,45 μm. Membranele filtrante au fost apoi

inoculate pe medii de cultură cromogene selective ChromID ESBL agar, ChromID OXA-48, ChromID CARBA (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), și incubate la 37° C ± 1° C pentru 4 ore, apoi pentru 18-20 ore la 44° C ± 1° C și respectiv pe ChromID VRE (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) și incubate la 37° C ± 1° C pentru 24 ore.

**Tabelul 3. Volumele și diluțiile probelor de apă uzată filtrate în cadrul studiului pilot.**

Tip probă		E coli								ESBL				OXA-48				CARBA				VRE						
Influent	Diluție	-5	-4	-4	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	-2	-1		-1	-1	0	0	-1	0	0		-3	-3	-2			
	Volum (ml)	3	1	3	1	1	3	1	3	3	1	3	1		1	3	1	3	3	1	3		1	3	1			
Efluent	Diluție	-2	-2	-1	-1	0	0			-3	-2	-1	0	0	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	-3	-3	-2	-1	0	0
	Volum (ml)	1	3	1	3	1	3			3	3	3	3	10	1	3	1	3	3	1	3	10	1	3	3	1	1	3

**Tabelul 4. Prevalența fenotipurilor de rezistență *Enterobacteriaceae* BLSE și CPE, precum și VRE în probe de apă uzată colectate înainte și după clorinare.**

Tip de probă de apă uzată analizată	Cod de identificare probă	<i>E. coli</i> BLSE UFC / 100 mL	KESC BLSE UFC / 100 mL	<i>E. coli</i> OXA - 48 UFC / 100 mL	KESC OXA-48 UFC / 100 mL	BN Carba UFC / 100 mL	BN Carba UFC / 100 mL	VRE UFC / 100 mL
Efluent	RA18001	0.7 x 10 <sup>5</sup>	0.2 x 10 <sup>6</sup>	Creștere confluentă	Creștere confluentă	Creștere confluentă	Creștere confluentă	0.5 x 10 <sup>8</sup>
Influent	RA18002	0.6 x 10 <sup>5</sup>	0.3 x 10 <sup>6</sup>	Creștere confluentă	0.1 x 10 <sup>6</sup>	Creștere confluentă	Creștere confluentă	0.6 x 10 <sup>7</sup>
Influent	RA18003	0.6 x 10 <sup>6</sup>	0.8 x 10 <sup>6</sup>	0.53 x 10 <sup>5</sup>	0.3 x 10 <sup>6</sup>	Creștere confluentă	Creștere confluentă	0.2 X 10 <sup>8</sup>
Efluent	RA18004	0.7 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	0.5 x 10 <sup>6</sup>	Creștere confluentă	Creștere confluentă	Creștere confluentă

Studiul probelor de apă uzată reprezentate de o probă de influent și una de efluent înainte de dezinfecție prin clorinare și respectiv o probă de influent și una de efluent după dezinfecție prin clorinare a condus la **detectia în toate probele a tulpinilor de *Enterobacteriaceae* cu fenotipuri de rezistență BLSE (beta-lactamaze de spectru larg) și CPE (carbapenemaze) și respectiv, de enterococi cu fenotip de rezistență la vancomicină (VRE)**. Analizele cantitative privind prevalența fenotipurilor de rezistență nu au relevat diferențe semnificative între influent și efluent și respectiv înainte și după tratamentul de dezinfecție prin clorinare (Tabelul 4). De asemenea, studiul pilot a demonstrat necesitatea ajustării diluțiilor de probe de apă uzate recoltate de la stațiile de epurare ale unităților spitalicești, pentru a putea realiza cuantificarea bacteriilor Gram-negative producătoare de carbapenemaze.

Au fost prelevate de pe membranele filtrante cultivate pe mediile de cultură cromogene **ChromID ESBL, ChromID OXA-48, ChromID CARBA, ChromID VRE un număr de 235 de izolate, respectiv: *E. coli* BLSE (40 tulpini), KESC BLSE (29), bacili NF (non fermentativi) BLSE (15 tulpini), bacili Gram negativi NF cu fenotip CPE (OXA-48 *E. coli* – 7 tulpini; OXA-48 KESC – 40 tulpini; CARBA *E. coli* – 1 tulpină, CARBA KESC – 39 și CARBA NF – 36 de tulpini) și enterococi cu fenotip VRE (25 tulpini) pentru identificare la nivel de specie.**

Analiza MALDI-TOF MS a pus în evidență faptul că mediile cromogene au selectat tulpini cu fenotipuri de rezistență aparținând următoarelor specii bacteriene țintă: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *P. aeruginosa*, *P. otitidis*, *E. faecium*, *S. epidermidis* și *S. aureus* (Tabelul 5). Mediile de cultură cromogene au prezentat o specificitate de detecție a organismelor țintă cu diferite fenotipuri de rezistență de: 100% pentru *E. coli* BLSE (40/40), VRE (25/25), *E. coli* CARBA (1/1), 97.93% pentru KESC BLSE, 94.87% pentru KESC CARBA (37/39), 94.44%

pentru NF CARBA (34/36), și 6.66% pentru NF BLSE. Organismele non-țintă identificate pe mediile de cultură cromogene au aparținut următoarelor specii bacteriene: *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*(rezultate fals-pozitive pentru NF CARBA),*S. epidermidis* și *A. baumannii* (rezultate fals-pozitive pentru KESC CARBA), *E. faecium*(rezultate fals-pozitive pentru KESC BLSE), *E. coli* și *S. aureus* (rezultate fals-pozitive pentru NF BLSE) (Tabelele 6-8).

**Tabelul 5. Diversitatea speciilor bacteriene cu fenotipuri de rezistență izolate pe medii de cultură cromogene**

Specii identificate MALDI-TOF MS	ChromID ESBL	ChromID OXA-48	ChromID CARBA	ChromID VRE
<i>E. coli</i>	40	0	1	0
<i>K. pneumoniae</i>	29	46	38	0
<i>E. faecium</i>	1	0	0	26
<i>E. cloacae</i>	2	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	0	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	12	22	0
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	0	2	1	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	9	0
<i>Pseudomonas otitidis</i>	0	0	2	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	2	0
<i>S. aureus</i>	1	0	0	0

**Tabelul 6. Specificitatea de detecție a fenotipurilor de rezistență pe mediul ChromID ESBL**

ChromID ESBL	<i>E. coli</i> BLSE	KESC BLSE	NF BLSE
Fenotip prezumtiv	40	29	15
Identificare MALDI-TOF MS	40 <i>E. coli</i>	28 (1 <i>E. faecium</i> )	1 <i>A. baumannii</i> (12 <i>E. coli</i> , 1 <i>S. aureus</i> , 1 UN)
Specificitate de detecție	100%	97,93%	6.66%

**Tabelul 7. Specificitatea de detecție a fenotipului CPE pe mediile ChromID OXA-48 și ChromID Carba**

ChromID OXA-48	<i>E. coli</i> OXA-48	KESC OXA-48	<i>E. coli</i> Carba	KESC Carba	NF Carba
Fenotip prezumtiv	7	40	1	39	36
Identificare MALDI-TOF MS	0 (6 <i>K. pneumoniae</i> , 1 <i>C. freundii</i> )	40	1	37 (1 <i>S. epidermidis</i> , 1 <i>A. baumannii</i> )	34 (1 <i>Proteus mirabilis</i> , 1 <i>K. pneumoniae</i> )
Specificitate de detecție	0	100%	100%	94.87%	94.44%

**Tabelul 8. Specificitatea de detecție a fenotipului VRE pe ChromID VRE.**

ChromID VRE	VRE
Fenotip prezumtiv	25
Identificare MALDI-TOF MS	25 <i>E. faecium</i>
Specificitate de detecție	100%

Pentru **identificarea suportului molecular al rezistenței la antibiotice** β-lactamice, quinolone, glicopeptide și macrolide (**CO, P4**) a fost obținut un lizat din masa celulară bacteriană dezvoltată pe

suprafața filtrelor corespunzătoare celui mai mare volum filtrat pentru fiecare tip de mediu cromogen utilizat. În tabelul 9 sunt listate probele corespunzătoare celui mai mare volum filtrat pentru fiecare tip de mediu cromogen utilizat, selectate pentru obținerea lizatelor totale necesare reacțiilor PCR simplex și multiplex. Pentru aceasta s-a trecut cu ansa calibrată de 1μl pe toată suprafața filtrului, iar materialul biologic prelevat a fost resuspendat în 100 μl soluție NaOH 0.05M + SDS 0.25%. Suspensia a fost incubată la temperatura de 95 °C, timp de 15 min. Ulterior, s-a adăugat un volum de 900 μl soluție TE 1x, urmat de vortexare ușoară, și centrifugare la 13.000 RPM timp de 3 minute. Supernatantul (800 μl) s-a preluat într-un tub Eppendorf nou și s-a păstrat la 4°C, pentru a fi utilizat ca matriță în reacțiile PCR. Liza celulară s-a realizat pentru fiecare probă în duplicat.

Pentru evidențierea genelor de rezistență la tulpini clinice izolate în aceeași secvență temporală s-a obținut lizatul celular utilizând un volum de 20 μl soluție NaOH 0.05M + SDS 0.25%, ulterior adăgându-se 180 μl soluție TE, ceilalți parametri fiind similari.

Primerii utilizați pentru identificarea suportului molecular al rezistenței la patogenii ESKAPE sunt listați în tabelul 10.

Reacțiile PCR au fost realizate în volum de 20 μl, utilizând kit-ul GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Producții de amplificare au fost vizualizate prin electroforeză în gel de agaroză 1 - 1,5% colorat cu bromura de etidiu. Pentru validarea reacțiilor PCR au fost utilizate controale pozitive și negative.

**Tabelul 9. Indicativele filtrelor de pe suprafața cărora s-au obținut lizatele totale**

Probe de apă uzată prelevate din influent (18002) și efluent (18001) – 21.11.2018 (înainte de clorinare)		Probe de apă uzată prelevate din influent (18003) și efluent (18004) – 23.11.2018 (după clorinare)	
Nr. crt	Cod probă	Nr. crt	Cod probă
1.1	RA18001 PS (-1) <sup>a</sup> , 3ml <sup>b</sup>	13.1	RA18003 PS (-2), 1ml
1.2	RA18001 PS (-1), 3ml	13.2	RA18003 PS (-2), 1ml
2.1	RA18001 ESBL (-1), 1ml	14.1	RA18003 ESBL (-1), 1ml
2.2	RA18001 ESBL (-1), 1ml	14.2	RA18003 ESBL (-1), 1ml
3.1	RA18001 OXA-48 (0), 1ml	15.1	RA18003 OXA-48 (0), 3ml
3.2	RA18001 OXA-48 (0), 3ml	15.2	RA18003 OXA-48 (0), 3ml
4.1	RA18001 CARB (0), 30ml	16.1	RA18003 CARB (0), 3ml
4.2	RA18001 CARB (0), 30ml	16.2	RA18003 CARB (0), 3ml
5.1	RA18001 MRSA (0), 3ml	17.1	RA18003 MRSA (0), 1ml
5.2	RA18001 MRSA (0), 15ml	17.2	RA18003 MRSA (0), 3ml
6.1	RA18001 VRE (0), 15ml	18.1	RA18001 VRE (-2), 1ml
6.2	RA18001 VRE (0), 15ml	18.2	RA18001 VRE (-2), 1ml
7.1	RA18002 PS (-1), 3ml	19.1	RA18004 PS (-2), 1ml
7.2	RA18002 PS (-1), 3ml	19.2	RA18004 PS (-2), 1ml
8.1	RA18002 ESBL (-1), 1ml	20.1	RA18004 ESBL (0), 10ml
8.2	RA18002 ESBL (-1), 1ml	20.2	RA18004 ESBL (0), 10ml
9.1	RA18002 OXA-48 (0), 1ml	21.1	RA18004 OXA-48 (0), 3ml
9.2	RA18002 OXA-48 (0), 3ml	21.2	RA18004 OXA-48 (0), 3ml
10.1	RA18002 CARB (0), 15ml	22.1	RA18004 CARB (0), 10ml
10.2	RA18002 CARB (0), 30ml	22.2	RA18004 CARB (0), 10ml
11.1	RA18002 MRSA (0), 15ml	23.1	RA18004 MRSA (0), 15ml
11.2	RA18002 MRSA (0), 15ml	23.2	RA18004 MRSA (0), 15ml
12.1	RA18002 VRE (0), 15ml	24.1	RA18004 VRE (0), 1ml
12.2	RA18002 VRE (0), 15ml	24.2	RA18004 VRE (0), 1ml

<sup>a</sup> cifrele indicate în paranteze reprezintă diluția probei de apă, urmată de <sup>b</sup> volumul filtrat

**Tabelul 10. Secvențele nucleotidice ale primerilor utilizate în experimentele PCR simplex și multiplex, dimensiunea ampliconilor obținuți și programul de amplificare al reacțiilor, unde ciclul I a constat din denaturarea inițială la 95° – 5 min, iar ultimul ciclu din elongarea finală la 72° – 10 min**

Genă țintă	Denumire primeri	Dimensiune amplicon (pb)	Al doilea ciclu de amplificare
<i>bla</i> TEM	TEM-F: ATA AAA TTC TTG AAG AC TEM-R: TTA CCA ATG CTT AAT CA	1097	30x (95° – 30 sec, 52° – 40 sec, 72° – 70 sec),
<i>bla</i> SHV	SHV-F: TGG TTA TGC GTT ATA TTC GCC SHV-R: GGT TAG CGT TGC CAG TGC T	868	30x (95° – 30 sec, 56° – 40 sec, 72° – 60 sec),
<i>bla</i> CTX-M	CTX-M-F: TCG TCT CTT CCA GAA TAA GG CTX-M-R: AAG GAG AAC CAG GAA CCA CG	1100	30x (95° – 30 sec, 56° – 40 sec, 72° – 60 sec),
<i>bla</i> OXA-48	OXA-48-A: TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG OXA-48-B: GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	744	30x (95° – 30 sec, 55° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> VIM	VIM-F: GAT GGT GTT TGG TCG CAT A VIM-R: CGA ATG CGC AGC ACC AG	389	30x (95° – 30 sec, 55° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> NDM	NDM-F: GCA GCT TGT CGG CCA TGC GG GC NDM-R: GGT CGC GAA GCT GAG CAC CGC AT	782	30x (95° – 30 sec, 55° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> KPC	KPC-F: ATGCACTGTATCGCGTCT KPC-R: TTTTCAGAGCCTTACTGCC	883	30x (95° – 30 sec, 55° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> OXA-23	OXA-23F: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA OXA-23R: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	30x (94° – 30 sec, 52° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> OXA-24	OXA-24F: GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA OXA-24R: AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	30x (95° – 30 sec, 52° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> OXA-58	OXA-58F: AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG OXA-58R: CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	30x (95° – 30 sec, 58° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>bla</i> OXA-51	OXA-51F: TAATGCTTTGATCGG CCT TG OXA-51R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	30x (95° – 30 sec, 52° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>qnrA</i>	QnrAm-F: AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG QnrAm-R: TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	580	35x (95° – 1 min, 54° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>qnrB</i>	QnrBm-F: GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG QnrBm-R: TTT GCY GYY CGC CCA GTC GAA	264	35x (95° – 1 min, 54° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>qnrS</i>	QnrSm-F: GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT QnrSm-R: TCT AAC CGT CGA GTT CGG CG	428	35x (95° – 1 min, 54° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>ermA</i>	ermA1: AAGCGGTAAACCCCTCTGA ermA2: TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	190	30x (95° – 30 sec, 54° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>ermB</i>	ermB-F: GAA AAA GTA CTC AAC CAA ATA ermB-R: AAT TTA AGT ACC GTT ACT	639	30x (95° – 30 sec, 55° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>ermC</i>	ermC1: AATCGTCAATTCCTGCAATGT ermC2: TAATCGTGAATACGGGTTTG	299	30x (95° – 30 sec, 54° – 40 sec, 72° – 50 sec)
<i>mecA</i>	mecA1: AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C mecA2: AGT TCT GCA AGT ACC GGA TTT GC	532	35x (94° – 1 min, 55° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>vanA</i>	vanA-F: ATGAATAGAATAAAAGTTGC vanA-R: TCACCCCTTTAACGCTAATA	1032	30x (94° – 1 min, 52° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>vanB</i>	vanB: ACG GAA TGG GAA GCC GA vanB: TGC ACC CGA TTT GCT TC	635	30x (94° – 1 min, 52° – 1 min, 72° – 1 min)
<i>vanC</i>	vanC: ATG GAT TGG TAC TGG TAT vanC: TAG CGG GAG TGM CCA GTA A	815	30x (94° – 1 min, 52° – 1 min, 72° – 1 min)

În scopul determinării prezenței carbapenemazelor dobândite au fost realizate patru reacții PCR simplex pentru evidențierea genelor codificatoare ale metalo- $\beta$ -lactamazelor (MBL) cel mai frecvent raportate la nivel global pentru patogenii ESKAPE (NDM, KPC, VIM, IMP) aparținând speciilor *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* și *Enterobacter* sp., dar și a carbapenemazelor din clasa D de beta-lactamaze (OXA-48 specifică enterobacteriilor și OXA-23, OXA-24, OXA-58 specifice bacililor Gram negativi non fermentativi). Suplimentar a fost identificată și carbapenemaza OXA-51 intrinsecă la *A. baumannii*.

Screening-ul genotipic realizat pe lizatul total obținut din masa celulară dezvoltată pe filtre a demonstrat prezența genelor codificatoare pentru  $\beta$ -lactamazele de spectru extins (BLSE: *bla*<sub>CTX-M</sub> și *bla*<sub>TEM</sub>), a metalo-beta-lactamazelor *bla*KPC, *bla*NDM, a carbapenemazelor de clasă de *bla*OXA-23,

*blaOXA-24*, *blaOXA-51* și *blaOXA-58*, a genelor de rezistență la quinolone *qnrA*, B, S în masa celulară aferentă tuturor filtrelor analizate. Gena *mecA* a fost identificată doar în proba de efluent din prima recoltare. Rezistența la vancomicină evidențiată prin prezența genei VanA a fost confirmată în toate probele analizate; VanB în cazul probelor provenite din efluent înainte și după clorinare. Rezistența la macrolide a fost evidențiată prin prezența genei *ermA* la trei din cele patru probe provenite din efluent înainte și după clorinare (18001; 18004), respectiv influent înainte de clorinare (18002) (tabelul 12).

Pentru tulpinile clinice izolate în aceeași secvență temporală, au fost evidențiați următorii markeri genetici de rezistență (tabelul 11) care s-au confirmat și în cazul probelor de apă uzată recoltate din proba de influent (18002, 18004) și efluent înainte și după clorinare (18001, 18003) cu excepția genei VanC (tabelul 12), care nu a fost identificată în nici una din cele patru probe recoltate din canalul colector.

*Screening*-ul genotipic s-a realizat și pe cele 16 tulpini clinice rezistente, izolate utilizând aceleași medii de izolare, din probe clinice (uroculturi, secreții de tract respirator, secreții de plagă, cateter, sondă traheală) recoltate în unitatea spitalicească selectată pentru studiul pilot în același interval temporal. La tulpinile clinice nu au fost detectate genele de rezistență la carbapeneme *blaKPC*, *blaOXA-23*, *blaOXA-58*),  $\beta$ -lactamice de spectru larg (*blaTEM*), macrolide (*ermA/B/C*) și quinolone (*qnrA/S*) (tabelul 11).

**Tabelul 11. Genele de rezistență identificate la tulpinile clinice analizate**

Cod tulpină	<i>blaOXA-23</i>	<i>blaOXA-24</i>	<i>blaOXA-48</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaCTX-M</i>	<i>blaSHV</i>	<i>qnrB</i>	<i>vanA</i>	<i>vanC</i>
4 <i>P. aeruginosa</i> spută									
5 <i>P. aeruginosa</i> spută									
7 <i>P. aeruginosa</i> aspirat bronșic									
8 <i>A. baumannii</i> plagă		+							
17 <i>A. baumannii</i> IOT		+							
2 VRE urocultură								+	
3 VRE vârf cateter									+
9 <i>K. pneumoniae</i> plagă			+		+				
10 <i>K. pneumoniae</i> urocultură			+			+			
11 <i>K. pneumoniae</i> urocultură					+		+		
12 <i>K. pneumoniae</i> urocultură					+				
13 <i>K. pneumoniae</i> IOT			+		+				
14 <i>K. pneumoniae</i> urocultură									
15 <i>K. pneumoniae</i> urocultură					+				
16 <i>K. pneumoniae</i> spută			+	+		+			
18 <i>K. pneumoniae</i> urocultură					+				

**Tabelul 12. Distribuția genelor codificatoare de carbapenemaze și BLSE în probele de apă uzată și tulpinile izolate concomitent din clinică analizate**

Gena	Probe analizate				Tulpini izolate din clinică
	18001	18002	18003	18004	
<i>blaOXA-48</i>	+	+	+	+	+
<i>blaNDM</i>	+	+	+	+	+
<i>blaKPC</i>	+	+	+	+	
<i>blaOXA-23</i>	+	+	+	+	

<i>bla</i> OXA-24	+	+	+	+	+
<i>bla</i> OXA-58	+	+	+	+	
<i>bla</i> OXA-51	+	+	+	+	
<i>bla</i> CTX-M	+	+	+	+	+
<i>bla</i> TEM	+	+	+	+	
<i>bla</i> SHV					+
vanA	+	+	+	+	+
vanB	+	-	-	+	
vanC	-	-	-	-	+
ermA	+	+	-	+	
ermB	-	-	-	-	
ermC	-	-	-	-	
qnrA	+	+	+	+	
qnrB	+	+	+	+	+
qnrS	+	+	+	+	

### ***Analiza metalelor grele, pesticidelor și antibioticelor în probele de ape uzate***

Au fost optimizate protocoalele pentru analiza metalelor grele și a altor elemente prin ICP-MS, analiza pesticidelor prin GC-MS/MS și a antibioticelor prin HPLC-MS/MS (P3)(pregătirea probei și analiza pentru cele trei categorii de compuși analizați), prin analiza a 4 probe de ape reziduale, recoltate înainte și după clorinare. Se pot determina prin acest tip de analiză, toate elementele pentru care s-a realizat etalonarea pe baza unor etaloane de concentrație corespunzătoare, astfel încât probele să nu fie citite în condiții de extrapolare a curbei de regresie. Pentru matrici specifice, se realizează un studiu de matrice pentru studiul erorilor sistematice care pot apare la concentrații mari ale unor elemente, din modificările randamentelor de ionizare în plasmă ale ionilor măsurați.

În cazul analizei GC-MS/MS a fost pusă la punct metoda de determinare a unui număr de 21 de pesticide, conform tabelului 13. Se poate observa că timpii de retenție obținuți (TR Obt) sunt foarte apropiați de timpul de retenție certificat ceea ce confirmă faptul că metoda poate fi aplicată cu succes în analiza acestor pesticide. Monitorizarea pesticidelor s-a făcut pe baza ionilor de interes indicați în tabel rezultatele obținute indicând faptul că aceste pesticide sunt sub limita de detecție a metodei (50ppt – raportat la proba de apă recoltată).

**Tabelul 13. Rezultatele analizei prin GC-MS/MS a prezenței pesticidelor în probele de apă uzată analizate**

COMPUS	TR certif	TR obt	Ioni monitorizați	RA18004	RA18003	RA18002	RA18001
Diclorvos	17.95	17.255	209, 185	ND	ND	ND	ND
Metacrifos	24.63	24.023	208, 125, 180	ND	ND	ND	ND
Sulfotep	28.81	28.253	322, 202, 97	ND	ND	ND	ND
Fonofos	30.77	30.182	109, 137, 246	ND	ND	ND	ND
Propetamphos	30.77	30.252	138, 194, 236	ND	ND	ND	ND
Diazinon	31.26	30.738	137, 179, 152	ND	ND	ND	ND
Etrimfos	31.84	31.308	292, 181, 153	ND	ND	ND	ND
Diclorfention	32.66	32.1	223, 272, 251	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos metil	33	32.457	286, 125	ND	ND	ND	ND

Fenclophos	33.56	33.023	285, 125	ND	ND	ND	ND
Pirimifos-metil	34.21	33.71	290, 276, 305	ND	ND	ND	ND
Malathion	34.55	34.063	125, 173, 93	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos	34.91	34.399	197, 199, 314	ND	ND	ND	ND
Bromofos-metil	35.53	35	331, 329	ND	ND	ND	ND
Pirimifos-etil	35.82	35.349	168, 318, 333	ND	ND	ND	ND
Clorfenvinfos	36.47	35.98	267, 269, 323	ND	ND	ND	ND
Metidation	37.03	36.541	145, 85	ND	ND	ND	ND
Bromophos-etil	37.17	36.678	359, 303, 357	ND	ND	ND	ND
Tetraclorvinphos	37.46	36.981	331, 329, 109	ND	ND	ND	ND
Ethion	40.1	39.652	231, 153, 97	ND	ND	ND	ND
Carbofenotion	40.81	40.335	157, 121, 153	ND	ND	ND	ND

În cazul analizei ICPMS se poate evidenția prezenta în concentrații relativ mari a unor elemente comune din ape (Mg, Al, K sau Ca) dar și prezența unor metale grele dintre care se pot evidenția Pb (doar în probele de apă codificate recoltate după clorinare – efluent și influent) sau Cr total, Ni, As care pot fi evidențiate în toate probele de apă la concentrații de ordinul 4 – 40 µg/l. Cadmiul, un alt element potențial cancerigen a fost sub limita de detecție a metodei, curba de calibrare fiind realizată pe domeniul 1-100ppb) (Tabelul 14).

**Tabelul 14. Analiza elementală prin ICPMS**

Element	RA18004	RA18003	RA18002	RA18001
7 Li [ No Gas ]	17	7	3	2
9 Be [ No Gas ]	0	0	0	0
11 B [ No Gas ]	81	44	67	21
24 Mg [ No Gas ]	6,878	5,779	3,918	3,719
27 Al [ No Gas ]	2,175	327	206	451
39 K [ No Gas ]	10,493	9,516	6,311	6,006
43 Ca [ No Gas ]	52,318	40,588	29,071	28,240
44 Ca [ No Gas ]	65,261	50,793	36,592	34,544
47 Ti [ No Gas ]	56	11	8	10
51 V [ No Gas ]	7	2	2	4
52 Cr [ No Gas ]	47 /3.5	8 /<1.3	10 /3.72	9 / <1.3
55 Mn [ No Gas ]	159	36	25	23
56 Fe [ No Gas ]	3,583	-	-	27
59 Co [ No Gas ]	2	0	0	0
60 Ni [ No Gas ]	40 /6.1	16 /2.7	6 /3.9	4 /2.7
63 Cu [ No Gas ]	650 /41.6	399 /23.1	63/31.4	27 /19.1
66 Zn [ No Gas ]	743 /246	204 /68	111 /279	407 /38
75 As [ No Gas ]	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
77 Se [ No Gas ]	7	7	4	12
88 Sr [ No Gas ]	224	187	154	150
95 Mo [ No Gas ]	21	10	5	4

107 Ag [ No Gas ]	6 /<3.5	1 /<3.5	1 /<3.5	1 /<3.5
111 Cd [ No Gas ]	<0.4/<0.4	<0.4/<0.4	<0.4/<0.4	<0.4/<0.4
121 Sb [ No Gas ]	3	2	1	0
137 Ba [ No Gas ]	346	105	39	43
151 Eu [ No Gas ]	0	0	0	2
153 Eu [ No Gas ]	1	0	0	1
205 Tl [ No Gas ]	0	0	0	0
208 Pb [ No Gas ]	35 /9.3	13 /7.3	- /25.2	- / 15
209 Bi [ No Gas ]	22	1	0	0
Hg	/<1	/<1	/<1	/<1
sum	143,186	108,064	76,601	73,711

Coloanele marcate în gri conțin 2 seturi de valori, determinate la momentul recoltării probei și la cca 7 zile de la recoltare

În cazul analizei LC-MS/MS, etalonarea s-a realizat utilizând antibioticele iar utilizate în unitățile spitalicești din România. Utilizând metodologia de lucru descrisă, au fost obținute valorile concentrațiilor în mg/L pentru 13 antibiotice, etalonarea fiind realizată cu materiale CRM la diferite concentrații, conform tabelelor de mai jos (Tabelul 16).

**Tabelul 16. Date cu privire la antibioticele analizate**

Nr. Crt.	Denumire	Masa CRM mg	Solubilitate	Formula molecular	M
1	MEROPENEM TRIHYDRATE CRS	110	water	<u>C17H31N3O8S</u>	437.508
2	CLINDAMYCIN HYDROCHLORIDE CRS	200	In water, 30.61 mg/L at 25 deg C (est)	C18H34Cl2N2O5S	461.44
3	CLINDAMYCIN PHOSPHATE CRS	250	Freely soluble in water DMSO: soluble 224mg/mL at 25°C	C18H34ClN2O8PS	504.97
4	TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE CRS	100	WATER 0.459 mg/mL	C22H25ClN2O8	480.9
5	TRIMETHOPRIM CRS	50	WATER 400 mg/L	C14H18N4O3	290.32
6	SULFAMETHOXAZOLE CRS	50	WATER 610 mg/L (at 37 °C)	C10H11N3O3S	253.28
7	COLISTIMETHATE SODIUM CRS	20	WATER	<u>C58H105N16Na5O28S5</u>	1749.811
8	COLISTIN SULFATE CRS -SEE LEAFLE-	25		2(C52H98N16O13).5(H2SO4)	2801.27
9	ERYTHROMYCIN FOR MICROBIOLOGICAL ASSAY CRS	100	WATER 2mg/ml ETHANOL	C37H67NO13	733.93
10	ERYTHROMYCIN B CRS	50	WATER 2mg/ml ETHANOL	C37H68NO12+	718.946
11	ERYTHROMYCIN C CRS	25	WATER 2mg/ml ETHANOL	<u>C36H65NO13</u>	719.91
12	IMIPENEM CRS	70	0.776 mg/mL	C12H17N3O4S	299.347
13	VANCOMYCIN HYDROCHLORIDE CRS	100	0.225 mg/mL	C66H76Cl3N9O24	1485.71

Astfel, au fost determinate calitativ și cantitativ anumite clase antibiotice prezente în probele de apă analizate. Dintre antibioticele monitorizate au fost identificate, în concentrații diferite, clindamicina, tetraciclina (în concentrațiile cele mai mari), urmate de eritromicina și vancomicina.

Similar cu cazul metalelor grele, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între concentrațiile detectate în afluent și influent, datorită probabil distribuției în echilibru/partiție apă/nămol, însă probele recoltate înainte de clorinare, par a avea o concentrație ușor mai mare de antibiotice.

Pentru antibioticele ceftazidim și imipenem s-au realizat studii de stabilitate în apă uzată. Cromatogramele înregistrate pentru probele de apă sunt prezentate în figurile 6 și 7, observându-se că antibioticele nu pot fi detectate în niciuna dintre probele de apă la concentrația adăugată.

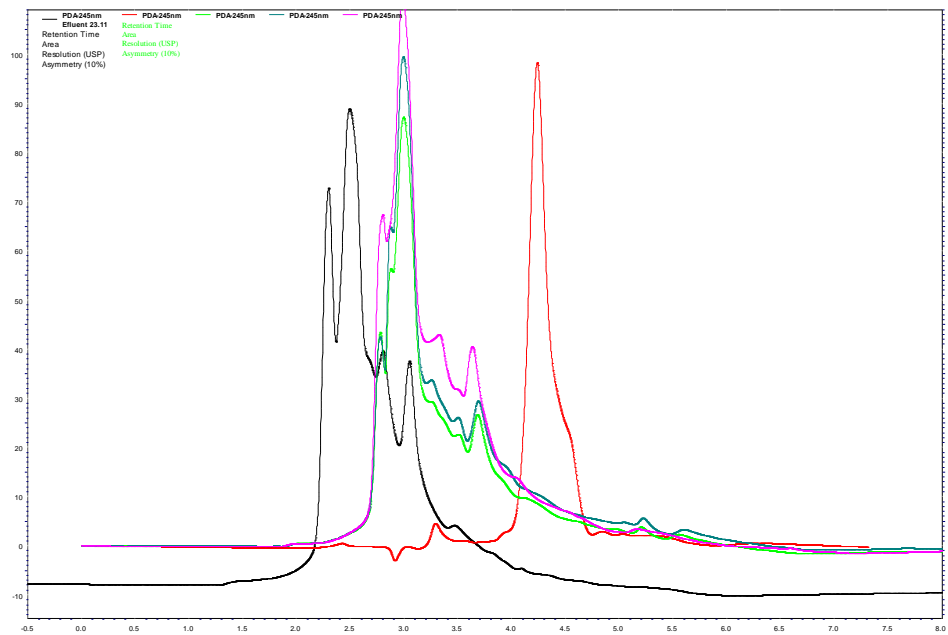


Figura 6. Cromatogramă înregistrată pentru probele de apă uzată, la care se adaugă proba de ceftazidim, soluție stoc (culoare roșie).

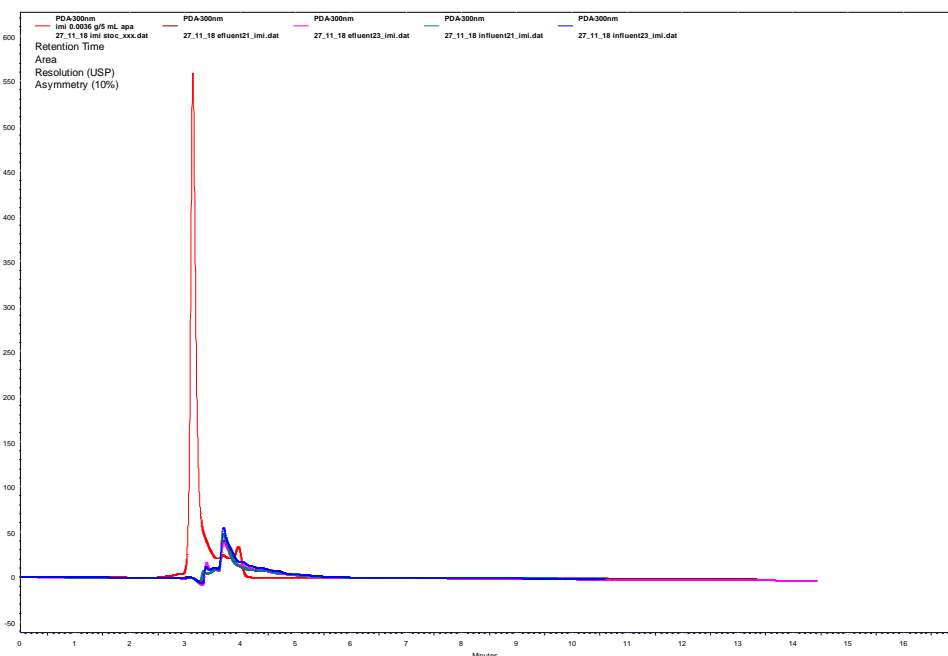


Figura 7. Cromatogramă înregistrată pentru probele de apă uzată, la care se adaugă proba de imipenem soluție stoc (culoare roșie).

**Tabelul 17. Rezultate cantitative pentru antibioticele analizate în probele de apă uzată recoltate înainte și după clorinare**

Nr. Crt.	Denumire	RA18002	RA18001	RA18004	RA18003
1	MEROPENEM TRIHYDRATE CRS			-	-
2	CLINDAMYCIN HYDROCHLORIDE CRS			-	
3	CLINDAMYCIN PHOSPHATE CRS	477.04	1177.24	254.25	339.46
4	TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE CRS	1182.15	1933.5	1063.36	199.73
5	TRIMETHOPRIM CRS				
6	SULFAMETHOXAZOLE CRS				
7	COLISTIMETHATE SODIUM CRS				-
8	COLISTIN SULFATE CRS -SEE LEAFLE-				
9	ERYTHROMYCIN FOR MICROBIOLOGICAL ASSAY CRS	0.47	0.98	0.4	0.61
10	ERYTHROMYCIN B CRS	8.15	14.91	6.55	2.61
11	ERYTHROMYCIN C CRS				-
12	IMIPENEM CRS				
13	VANCOMYCIN HYDROCHLORIDE CRS		121.31	117.21	

### Concluzii

În cadrul acestei etape au fost optimizate protocoalele de lucru și au fost redactate procedurile operatorii standard care vor fi utilizate în etapele următoare.

Procedurile optimizate au fost aplicate pentru realizarea studiului pilot de la nivelul unei unități spitalicești și al stației de tratare a acesteia. În cadrul studiului pilot au fost analizate un număr de patru probe de apă uzată provenite de la o unitate spitalicească din București, respectiv 2 probe de influent și 2 de efluent recoltate înainte și respectiv la câteva ore după dezinfectia prin clorinare. Analiza probelor de apă uzată a inclus determinarea unor parametri clasici microbiologici, respectiv bacterii coliforme totale, bacterii coliforme fecale, enterococi (streptococi fecali) și fizico- chimici: pH, materii în suspensie, CCOCr, CBO<sub>5</sub>, detergenți, utilizând metode standardizate, cât și analiza diferitelor categorii de poluanți (pesticide, metale grele, antibiotice) prin 3 metode instrumentale distincte (ICP-MS, GC-MS/MS și HPLC-MS/MS), optimizate în cadrul primei etape a proiectului. De asemenea, probele de apă uzată diluate în prealabil și concentrate prin filtrare au fost analizate pentru detecția de bacterii rezistente la antibiotice din grupul ESKAPE, prin metode dependente de cultivare, utilizând medii de cultură cromogene selective: ChromID ESBL agar, ChromID OXA-48, ChromID CARBA, ChromID VRE and ChromID MRSA.

Cele patru probe analizate, recoltate în interval de 2 zile, înainte și după clorinare, au fost relativ similare în ceea ce privește parametrii microbiologici și fizico-chimici investigați. Din toate cele 4 probe au fost izolate cu densitate relativ similară tulpini de *Enterobacteriaceae* cu fenotipuri de rezistență BLSE (beta-lactamaze de spectru larg) și CPE (carbapenemaze) și respectiv, de enterococi cu fenotip de rezistență la vancomicina (VRE).

Analiza MALDI-TOF MS a pus în evidență prezența următoarelor specii bacteriene țintă: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *P. aeruginosa*, *P. otitidis*, *E. faecium*, *S. epidermidis* și *S. aureus*. Mediile de cultură cromogene au prezentat o specificitate de detecție a organismelor țintă cu diferite fenotipuri de rezistență de: 100% pentru *E. coli* BLSE (40/40), VRE (25/25), *E. coli* CARBA (1/1), 97.93% pentru KESC BLSE, 94.87% pentru KESC CARBA (37/39), 94.44% pentru NF CARBA (34/36), și 6.66% pentru NF BLSE.

*Screening*-ul genotipic a demonstrat prezența genelor codificatoare pentru  $\beta$ -lactamazele de spectru extins (BLSE: *bla*<sub>CTX-M</sub> și *bla*<sub>TEM</sub>), a metalo-beta-lactamazelor *bla*KPC, *bla*NDM, a carbapenemazelor de clasă de *bla*OXA-23, *bla*OXA-24, *bla*OXA-51 și *bla*OXA-58 și a genelor de rezistență la quinolone *qnr*A, B, S în masa celulară aferentă tuturor filtrelor analizate. Gena *mecA* a fost identificată doar în proba de efluent recoltată înainte de clorinare. Rezistența la vancomicină evidențiată prin prezența genei VanA a fost confirmată în toate probele analizate; VanB în cazul probelor provenite din efluent înainte și după clorinare. Rezistența la macrolide a fost evidențiată prin prezența genei *ermA* la trei din cele patru probe provenite din efluent înainte și după clorinare, respectiv influent înainte de clorinare. Pentru tulpinile clinice izolate în aceeași secvență temporală, au fost evidențiați markeri genetici detectați în probele de apă uzată cu excepția genelor VanC și *bla*<sub>SHV</sub> prezente exclusiv la izolatele clinice. La tulpinile clinice nu au fost detectate genele de rezistență la carbapeneme *bla*KPC, *bla*OXA-23, *bla*OXA-58),  $\beta$ -lactamice de spectru larg (*bla*TEM), macrolide (*ermA/B/C*) și quinolone (*qnrA/S*).

În cadrul acestei etape au fost optimizate metodele de identificare/cuantificare a elementelor de interes din ape: metale grele prin ICPMS, pesticide prin GC-MS/MS și antibiotice prin LC-MS/MS și au fost realizate primele analize pe probele de apă uzate recoltate pentru studiul pilot.

Dacă în cazul analizei de pesticide conținutul acestora a fost sub limita de detecție a metodei (pentru mixul de pesticide utilizat) în cazul analizei elementale prin ICPMS a fost evidențiate prezența unor elemente cu toxicitate ridicată: Cr total, Ni, As, Pb.

În cazul antibioticelor, a fost evidențiată prezența antibioticelor: clindamicina, tetraciclina, eritromicina și vancomicină. Nu a fost evidențiată prezența meropenemului, trimetoprimului, sulfametoxazolului, colistinului sau a imipenemului.

Studiul pilot a demonstrat necesitatea ajustării diluțiilor de probe de apă uzate recoltate de la stațiile de epurare ale unităților spitalicești, pentru a putea realiza cuantificarea bacteriilor Gram-negative producătoare de carbapenemaze. De asemenea, rezultatele obținute în cadrul studiului pilot indică necesitatea extinderii gamei de pesticide, în special prin includerea unor pesticide persistente. Se impun măsurători suplimentare ale conținutului de compuși biologic activi (antibiotice, pesticide, metale grele) și din nămol pentru a explica conținutul relativ egal de antibiotice/metale grele în cazul influentului comparativ cu efluentul. Corelarea rezultatelor privind nivelul de metale grele, pesticide sau antibiotice în probele de apă uzată, de suprafață și de nămol este absolut necesară pentru optimizarea protocolului de monitorizarea acestor contaminanți în pești.

## Diseminarea rezultatelor:

### Articol BDI:

- *Review on methods for analyzing the antibiotic resistance in wastewater samples*. Luminita Gabriela Marutescu, Mariana Carmen Chifiriuc\*, Mircea Ioan Popa. Infectio.ro. DOI: 10.26416/Inf.55.3.2018.2035. <https://www.medichub.ro/reviste/infectio-ro/review-al-metodelor-de-analiza-a-rezistentei-la-antibiotice-in-probele-de-apa-reziduala-id-2035-cmsid-67>

### Conferințe:

#### Prezentări orale:

- Măruțescu Luminița. *Metode de detectare și cuantificare a rezistenței la antibiotice în ape uzate*. Conferința anuală a Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară "Cantacuzino" , 20 nov 2018, București.

- Chifiriuc Mariana Carmen. *RADAR - "Selecția și diseminarea genelor de rezistență la antibiotice de la nivelul stațiilor de epurare a apelor uzate în mediul acvatic și sectorul clinic"* Conferința anuală a Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară "Cantacuzino" , 20 nov 2018, București.

## Bibliografie

1. Bratu S., Landman D., Alam M., Tolentino E., Quale J. 2005, Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2):776-8.
2. Woodford N., Ellington M.J., Coelho J.M., Turton J.F., Ward M.E., Brown S et al. 2006, Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 27(4): 351-353.
3. Strommenger B., Kettlitz Ch., Werner G., and Witte W., 2003, Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4089–4094.
4. Saha B., Singh A.K., Ghosh A., Bal M., 2008, Identification and characterization of a vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia), *Journal of Medical Microbiology*, 57, 72–79.
5. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* , 54, 24-38.
6. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Woodford N, Pitout JD. New Delhi Metallo-beta-lactamase from traveler returning to Canada. *Emerg Infect Dis* 2011b;17:240–2.
7. Pitout J.D.D., Daniel B. Gregson D.B., Poirel L., McClure J.A., Le P., Deirdre L. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo--Lactamases in a Large Centralized Laboratory Church. *Journal of Clinical Microbiology*, 3129–3135.