

PROIECT NR. PN-III-P3-3.1-PM-RO-CN-2018-0147

CONTRACT NR. 5 BM

RAPORT DE ACTIVITATE

PERIOADA RAPORTATĂ 14/12/2018-05/12/2019

- **Titlul proiectului** - *STUDII IN SILICO ȘI EXPERIMENTALE ALE UNOR PLATFORME GENETICE MOBILE DE REZISTENȚĂ MULTIPLĂ LA ANTIBIOTICE [RESCUE - RESISTANCE]*
- **Nr. contractului** - PN-III-P3-3.1-PM-RO-CN-2018-0147 (CONTRACT NR. 5 BM)
- **Anul finalizării** - 2019
- **Durata proiectului** - 18 luni
- **Partener român** - Universitatea din București, Reprezentant legal Rector prof. dr. Mircea Dumitru
- **Director de proiect** - Prof. univ. dr. Mariana Carmen Chifiriuc
- **Partener străin** - West China Hospital, Sichuan University, Director de proiect prof.dr. Xiaohui Wang
- **Obiective generale urmărite**

Obiectivul general al proiectului este studiul evoluției locale a rezistenței la antibiotice (AR) la izolate clinice și din rețeaua de apă uzată de bacili Gram-negativi, multirezistente la antibiotice (MDR), prin studiul suportului genetic al AR și al transferabilității genelor de rezistență la antibiotice (ARG) prin intermediul elementelor genice mobile (MGE), pentru o mai bună cunoaștere a epidemiologiei moleculare a AR în România (diferențierea clonelor AR emergente local de cele regionale / globale) și îmbunătățirea managementului local al AR.

- **Descrierea științifică și tehnică a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor**

REZUMATUL ETAPEI

Activitățile prevăzute pentru această etapă au fost axate pe secvențierea unor gene de rezistență sau genomuri bacteriene și pe analiza bioinformatică, atât a datelor de secvențiere obținute, cât și a conformației și interacțiunii proteinelor codificatoare pentru gene de rezistență la antibiotice.

În cadrul celei de-a doua etape au fost analizate 12 tulpini de enterobacterii, 2 izolate din clinică și 10 izolate din mediu pe medii selective (probe de apă uzată), respectiv 10 tulpini de *Klebsiella pneumoniae*, 1 tulpină de *Escherichia coli* și o tulpină de *Enterobacter kobei*. De asemenea, au fost incluse în studiu și 12 tulpini de bacili Gram-negativi (BGN) nonfermentativi, 6

izolate din clinică și 6 izolate din probe de apă uzată – *Acinetobacter baumannii*.

Determinarea suportului genetic al ARG s-a realizat prin reacții PCR pentru ARG ce codifică producerea de β -lactamaze, respectiv *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, și *bla*_{CTX-M}. Tulpinile analizate au prezentat între 1 și 3 gene de rezistență la antibioticele β -lactamice, codificatoare pentru ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}) și/sau carbapenemaze (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}).

O parte dintre tulpinile analizate, respectiv două tulpini de *K. pneumoniae*, două tulpini de *A. baumannii*, o tulpină de *E. coli* și o tulpină de *E. kobei* au fost secvențiate (*Next Generation Sequencing - pair-end whole genome sequencing – MiSeq System Sequencer*, Illumina), rezultatul analizei bioinformatică a genelor de rezistență la antibioticele β -lactamice fiind în concordanță cu rezultatele obținute în urma experimentelor PCR. De asemenea, analiza acestora a oferit o imagine de ansamblu a suportului genetic al rezistenței la toate clasele de antibiotice și a confirmat fenotipul MDR (prezența de gene de rezistență la 4-8 clase de antibiotice) al acestor tulpini.

Studiul transferabilității ARG la antibioticele β -lactamice s-a realizat în cadrul acestei etape prin 3 experimente de conjugare, efectuate atât în mediu lichid (*Liquid mating*), cât și pe mediu solid (*Filter mating*). Majoritatea tulpinilor de *Enterobacteriaceae* și trei dintre tulpinile de *A. baumannii* incluse în experimentele de conjugare s-au dovedit a fi tulpini conjugative, cea mai mare parte a lor conjugând cu precădere pe mediu solid (filtru). Rezultatele PCR obținute pentru transconjuganți au evidențiat transferul unora dintre genele care conferă rezistența la antibioticele β -lactamice, în cazul uneia dintre tulpinile de *K. pneumoniae* fiind evidențiate trei gene transferate simultan, ceea ce sugerează localizarea acelor gene în aceleași elemente genetice mobile și posibilitatea diseminării acestora pe orizontală

Studiile conformaționale au indicat conformații ale proteinelor Oxa-23 și SHV-2 codificate de alelele identificate la tulpinile circulante în România studiate identice cu cele existente în bazele de date internaționale.

În cadrul acestei etape au avut loc două vizite de lucru, la care au participat 3 membri ai echipei din China și 4 membri ai echipei din România și a fost organizat un workshop internațional în China, cu participarea membrilor echipei române.

Apreciem că toate obiectivele și activitățile propuse au fost îndeplinite în totalitate.

INTRODUCERE

Utilizarea carbapenemelor pentru tratarea infecțiilor determinate de tulpini de *K. pneumoniae* multirezistente a dus la creșterea frecvenței tulpinilor rezistente, inclusiv în România, frecvență mult mai ridicată decât în cazul altor BGN, ca de exemplu *E. coli* (Figura 1, 3). Cu toate acestea, tulpinile de *A. baumannii* înregistrează cea mai ridicată rată de rezistență la carbapeneme

determinată atât de gene de rezistență dobândite prin transfer orizontal de gene, cât și prin prezența unor gene localizate cromosomal (Figura 2).

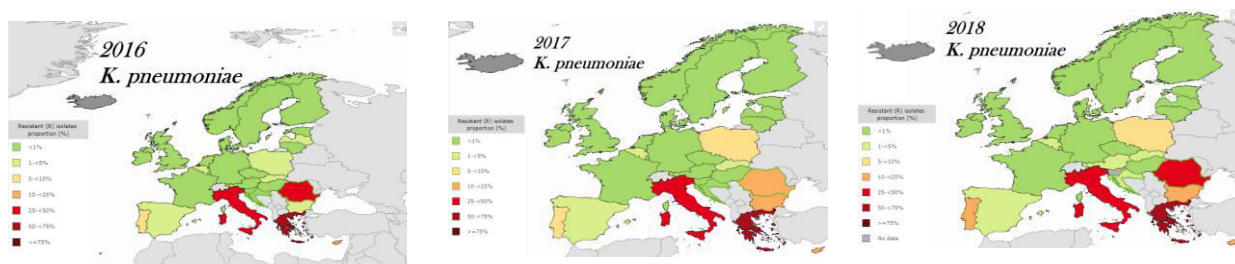


Figura 1 Frecvența izolatelor de *K. pneumoniae* rezistente la carbapeneme în perioada 2016-2018 în țările europene participante la programul EARS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance*). Deși frecvența rezistenței a oscilat pe parcursul anilor, România (31,4%/22,5%/26,8%) se situează printre țările cu nivelul cel mai ridicat al rezistenței, alături de Grecia (66,9%/65,7%/63,9%) și Italia (33,9%/29,7%/26,8%).

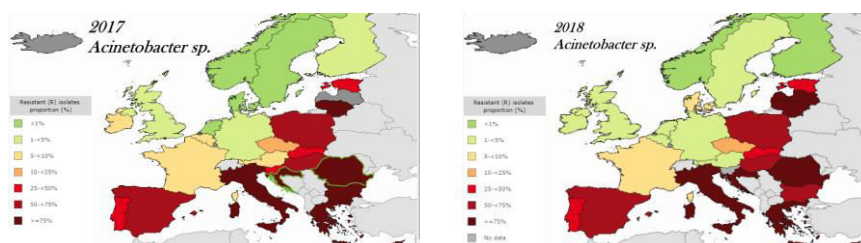


Figura 2 Frecvența izolatelor de *Acinetobacter* sp. rezistente la carbapeneme în perioada 2017-2018 în țările europene participante la programul EARS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance*). Deși frecvența rezistenței a oscilat pe parcursul anilor, România se situează pe locul 4 (87,4%/85,3%), după Croatia (96,2%/95,5%), Grecia (94,8%/92,4%) și Lituania (88,5% / 89,8%).

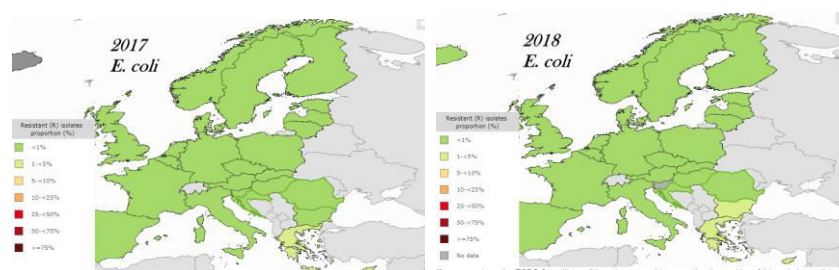


Figura 3 Frecvența izolatelor de *E. coli*. rezistente la carbapeneme în în perioada 2017-2018 în țările europene participante la programul EARS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance*). Nivelul cel mai ridicat în 2017 s-a înregistrat în Grecia (1,6%), Cipru (1,3%) și România (0,4%).

Activitățile prevăzute pentru această etapă, respectiv au fost axate pe secvențierea unor gene sau genomuri bacteriene, selectate în etapa curentă sau în cea anterioară a proiectului și pe analiza bioinformatică, atât a datelor de secvențiere obținute, cât și de conformație și interacțiune a proteinelor codificatoare pentru gene de rezistență la antibiotice.

MATERIALE ȘI METODE

Determinarea suportului genetic al AR

Obținerea ADN bacterian pentru *screening*-ul genelor s-a făcut prin metoda izolării ADN cu soluție NaOH și SDS (liza alcalina). În tuburi Eppendorf pentru PCR se adaugă 20 μl soluție NaOH 0.05 M + SDS 0.25%, în care se descarcă o ansă de cultură bacteriană incubată pentru aproximativ 24h (1-5 colonii), după care amestecul se introduce pentru 15 minute în aparatul de PCR la 95°C. Ulterior, se adaugă 180 μl TE 1%, se centrifughează 3 minute la 13000 rpm și se recuperează supernatantul. Probele de ADN se păstrează la 4 grade pe termen scurt și -20°C pe termen lung.

Pe baza rezultatelor fenotipice (izolare de pe medii selective, testul Blue-Carba pozitiv), s-a recurs la testarea moleculară a prezenței unor gene asociate frecvent cu rezistența la antibioticele β-lactamice și producerea de β-lactamaze, respectiv carbapenemaze (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}) și enzime de tipul ESBL (extended spectrum β-lactamas: *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}).

Pentru amplificarea acestor gene, au fost folosiți primeri descriși în literatură, conform tabelului 1:

Tabelul 1. Primeri utilizați pentru *screening*-ul molecular

Gena-țintă	Denumire primeri	Secvența oligonucleotidică a primerilor	Dimensiunea ampliconului	Referința
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	5' CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG 3'	754	Cotar (date nepublicate)
	CTX-M-R	5' GGCTGGGTGAAGTAAGTGAC 3'		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	5' ATAAAATTCTTGAAGACGAAA 3'	1080	Eftekhar și colab 2005
	TEM-R	5' GTCAGTTACCAATGCTTAATC 3'		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-F	5' GCGTGGTAAAGGATGAACAC 3'	438	Poirel și colab, 2011
	OXA-R	5' CATCAAGTTCAACCCAACCG 3'		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-F	5' GGTGGCGATCTGGTTTC 3'	621	Poirel și colab, 2011
	NDM-R	5' CGGAATGGCTCATCACGATC 3'		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	5' GATGGTGTGGTTCGCATA 3'	390	Poirel și colab, 2011
	VIM-R	5' CGAATGCGCAGCACCAG 3'		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	5' GGAATAGAGTGGCTTAA(C/T)TCTC 3'	232	Poirel și colab, 2011
	IMP-R	5' GGTTTAA(C/T)AAAACAACCACC 3'		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	5' CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG 3'	798	Poirel și colab, 2011
	KPC-R	5' CTTGTCATCCTTGTTAGGCG 3'		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	5' TGGTTATGCGTTATATTCGCC 3'	870	Eftekhar și colab 2005
	SHV-R	5' GGTTAGCGTTGCCAGTGCT 3'		
<i>bla</i> _{SIM}	SIM-F	5' TACAAGGGATTCGGCATCG 3'	570	Poirel și colab, 2011
	SIM-R	5' TAATGGCCTGTTCCCATGTG 3'		
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23-F	5' ATGAGTTATCTATTTTGTC-3'	501	Woodford și colab., 2006
	OXA-23-R	5' TGTC AAGCTCTTAAATAATA-3'		
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA24/40-F	5' GCAGAAAGAAGTAAARCGGGT3'	270	Bogaerts și colab., 2013
	OXA24/40-R	5' CCAACCGWGTCAACCAACCTA3'		
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA-51-F	5' TAATGCTTTGATCGGCCTTG3'	353	Woodford și colab., 2006
	OXA-51-R	5' TGGATTGCACTTCATCTTG3'		
<i>bla</i> _{VEB}	VEB-F	5' GACTTCCATTTCCCGATG C 3'	643	Poirel și colab, 2001
	VEB-R	5' GACTCTGCAACAAATAC GC 3'		
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	5' ATGCGCTTCATTCACGCAC 3'	643	Poirel și colab, 2001
	GES-R	5' CTATTTGTCCGTGCTCAGG 3'		

Componentele reacției PCR și concentrațiile în care acestea au fost utilizate, programul de amplificare și temperaturile de atașare ale primerilor se regăsesc în tabelele 2 și 3.

Tabelul 2. Componentele reacției PCR și concentrațiile în care acestea au fost utilizate.

Etapa		Temperatura					Durata
Denaturare inițială		95°C					10 min
35 x	Denaturare	95°C					30 sec
	Ațașare primeri	blaTEM 59°C	blaSHV 57°C	blaOXA-48 57°C	blaNDM-1 58°C	blaVIM 56°C	30 sec
		blaKPC 56°C	blaIMP blaOXA-23 blaOXA-24 blaOXA-51 52°C	blaCTX-M 58°C	blaSIM 57°C		
Elongare	72°C					50 sec-1:10 min (în funcție de dimensiunea apliconului)	

Tabelul 3. Programul de amplificare și temperaturile de ațașare ale primerilor.

Gena	Concentrația						Volum final
	primeri	MgCl ₂	dNTP	ADN-TaqPol	tampon reacție	ADN	
<i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{IMP} <i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA-23} <i>bla</i> _{OXA-24} <i>bla</i> _{OXA-51} <i>bla</i> _{SIM} <i>bla</i> _{VEB} <i>bla</i> _{GES}	0,2 μM	2 mM	0,2 μM	0,025 Uμl	1X	10X	20μl

Modelarea proteinelor codificate de genele de rezistență identificate a fost realizată folosind tool-ul online Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), modelarea fiind efectuată pe baza secvențelor depozitate în baza de date aferentă.

În cazul unui număr de șase tulpini incluse în studiu s-a realizat secvențiere (*pair-end whole genome sequencing* – *MiSeq System Sequencer*, Illumina). Pentru pregătirea probelor, s-a utilizat Kitul Nextera™ XT DNA Library Prep Kit (Figura 4).

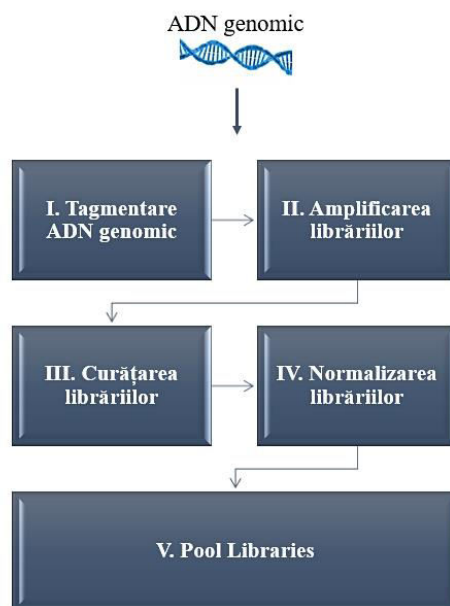


Figura 4. Schema pregătirii librăriei urmând protocolul Nextera™ XT DNA Library Prep Kit

Etapele pregătirii librăriei pentru secvențiere - Nextera™ XT DNA Library Prep Kit:

I. Tagmentarea ADN genomic

Pentru acest pas se utilizează Nextera transposome pentru tagmentarea ADN genomic prin care ADN este fragmentat, iar fragmentele sunt marcate (tagged) cu adaptori.

Procedură:

1. Se adaugă 10 μ l TD (Tagment DNA Buffer) și 5 μ l ADN genomic normalizat pentru fiecare probă, peste care se vor adăuga 5 μ l ATM (Amplicon Tagment Mix) și se amestecă prin pipetare.
2. Se centrifughează 1 minut la 280 x g.
3. Se pun probele în aparatul de PCR și se rulează programul de tagmentare (55°C - 5 min și se păstrează la 10°C).
4. Se adaugă 5 μ l NT (Neutralize Tagment Buffer).
5. Se centrifughează 1 minut la 280 x g.
6. Se incubează 1 minut la temperatura camerei.

I. Amplificarea Librărilor/Bibliotecilor

În acest pas se amplifică ADN tagmentat și se adaugă secvențele index (1 (i7) și 2 (i5)) și secvențele adaptor care determină formarea clusterelor.

Procedură:

1. Se distribuie secvențele index în următoarea ordine:
 - Index 1 (i7) în coloanele 1-6 ale unei plăcuțe cu 96 de godeuri.
 - Index 2 (i5) în rândurile A-D ale plăcuței.
1. Cu o pipetă multicanal, se adaugă 5 μ l din fiecare index 1 (i7) pe fiecare coloană.

2. Cu o pipetă multicanal, se adaugă 5 μ l din fiecare index 2 (i5) pe fiecare rând.
3. Se adaugă 15 μ l NPM (Nextera PCR Master Mix) pentru fiecare probă și se mixează prin pipetare.
4. Se centrifughează 1 minut la 280 x g.
5. Se introduc probele în aparatul de PCR și se rulează următorul program de amplificare (50 μ l):
 - 72°C – 3 min
 - 95°C – 30 sec
 - 12 cicluri: 95°C – 10 secunde; 55°C – 30 secunde; 72°C – 30 secunde;
 - 72°C – 5 min
 - Se păstrează la 10°C.

I. **Curățarea librăriilor/Bibliotecilor**

În această etapă se utilizează AMPure XP beads pentru purificarea librăriilor și eliminarea fragmentelor scurte.

Procedură:

1. Se centrifughează 1 minut la 280 x g.
2. Se transferă cei 50 μ l de produs PCR într-o plăcuță de 96 godeuri nouă.
3. Se adaugă 30 μ l AMPure XP beads în fiecare probă.
4. Se amestecă la 1800 rpm – 2 min.
5. Se incubează la temperatura camerei – 5 min.
6. Se așează pe placa magnetică și se așteaptă până când lichidul devine limpede (aproximativ 2 min).
7. Se îndepărtează supernatantul din fiecare probă.
8. Se efectuează două spălari:
 - Se adaugă 200 μ l EtOH 80% în fiecare probă.
 - Se incubează pe placa magnetică – 30 sec.
 - Se îndepărtează supernatantul.
1. Pentru evaporarea EtOH rămas în probe, se incubează la temperatura camerei – 15 min.
2. Se îndepărtează plăcuța de pe placa magnetică.
3. Se adaugă 52.5 μ l RSB (Resuspension Buffer) în fiecare probă.
4. Se amestecă la 1800 rpm – 2 min.
5. Se incubează la temperatura camerei – 2 min.
6. Se așează pe placa magnetică și se așteaptă până când lichidul devine limpede (2 min).
7. Se transferă 50 μ l din supernatant într-o plăcută cu 96 de godeuri nouă.

I. Normalizarea Librărilor/Bibliotecilor

În această etapă sunt normalizate librăriile pentru a asigura o reprezentare uniformă a fiecăreia în amestecul final.

1. Se transferă 20 μ l supernatant într-o plăcuță cu 96 de godeuri nouă.
2. Se adaugă 44 μ l LNA1 (Library Normalization Additives 1) într-un tub de 15 ml pentru fiecare probă.
3. Se adaugă 8 μ l LNB1 (Library Normalization Beads 1) în tubul de 15 ml (care conține cei 44 μ l LNA1) pentru fiecare probă.
4. Se adaugă 45 μ l din amestecul pregătit anterior în fiecare librărie.
5. Se amestecă la 1800 rpm – 30 min.
6. Se așează pe placa magnetică până când lichidul devine limpede (2min).
7. Se îndepărtează supernatantul din fiecare probă.
8. Se efectuează două spălari:
 - a. Se adaugă 45 μ l LNW1 (Library normalization Wash 1) în fiecare godeu.
 - b. Se amestecă la 1800 rpm – 5 min.
 - c. Se așează pe placa magnetică până când lichidul devine limpede (2 min).
 - d. Se îndepărtează supernatantul.
1. Se adaugă 30 μ l NaOH 0.1 N în fiecare godeu pentru efectuarea eluției.
2. Se amestecă la 1800 rpm – 5 min.
3. Se adaugă 30 μ l LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1) pentru fiecare probă într-o placă nouă.
4. Se așează plăcuța în care s-a efectuat eluția pe placa magnetică (2 min).
5. Se transferă supernatantul în plăcuța pregătită la pasul 11.
6. Se centrifughează la 1000 x g – 1 min.

I. Pool Libraries (Combinarea librăriilor/bibliotecilor).

În această etapă, librăriile normalizate sunt combinate, diluate și denaturate înainte de încărcarea în secvențiator.

Procedură:

1. Se centrifughează la 1000 x g – 1 min.
2. Se transferă 5 μ l din fiecare librărie într-un tub nou și se inversează pentru a se amesteca.
3. Se realizează diluția finală a amestecului în funcție de tipul de secvențiator.

Asamblarea și adnotarea genomurilor

Asamblarea *de novo* s-a efectuat cu software-ul SPAdes, pentru adnotare s-au utilizat *software* și *tool*-uri precum CARD (McArthur și colab., 2013), BLAST, ISFinder (Siguer și colab.,

2006), PlasmidFinder, ResFinder, VirulenceFinder, INTEGRALL (Moura și colab., 2009).

Testarea transferabilității rezistenței la antibiotice prin experimente de conjugare

Pentru efectuarea acestei etape, au fost realizate atât experimente de conjugare în mediu lichid (*Liquid mating*), cât și pe mediu solid (*Filter mating*). În vederea conjugării au fost preparate 3 medii de cultură (protocolul 1): mediu lichid neselectiv (LB/Nutrient Broth), mediu solid neselectiv (LB solid, Nutrient Agar) și un mediu selectiv (MacConkey) în care au fost încorporați markerii de selecție a transconjuganților, respectiv azidă de sodiu (150μg/ml) și imipenem (1 μg/ml). Markerii au fost selectați în conformitate cu tulpinile bacteriene incluse în studiu. Tulpina care are rolul de acceptor în cazul tulpinilor de *Enterobacteriaceae* (A) (*E. coli* J53) prezintă rezistență la azida de sodiu, este derivată din tulpina *E. coli* K-12, fiind utilizată ca acceptor în experimentele de conjugare (Yi et al, 2012). Tulpinile care au rolul de donori (D), au fost selectate pe baza prezenței ARG la antibioticele β-lactamice, fiind tulpini producătoare de β-lactamaze. Azida de sodiu este un component stabil ce poate fi introdus în mediu în orice moment al preparării, însă antibioticul trebuie introdus după ce temperatura mediului scade la cel puțin 60° C. Această etapă a conjugării s-a efectuat utilizând 4 tipuri de mediu, BHI (Brain heart infusion), simplu, cu adaos de azidă de sodiu (Na₃N), cu Imipenem (IPM) și cu azidă de sodiu și imipenem. Concentrația finală de Na₃N -> 0.5ml soluție 100X pentru 100ml BHI. Concentrația finală de imipenem, 1μg/ml. Pentru Filter s-a utilizat 200μl D + 400μl R în 400μl BHI Lichid iar pentru Lichid, 500 μl D + 500 μl R. Pentru *Enterobacteriaceae* fost utilizat un alt al doilea protocol (protocolul 2) utilizând 4 tipuri de mediu, BHI (Brain heart infusion), simplu, cu adaos de rifampicină (Rif), cu meropenem (MEM) și cu Rif și MEM. Concentrația finală a RIF a fost 250mg/L iar concentrația finală a MEM, 1μg/ml. Pentru Filter s-a utilizat 200μl D + 400μl R în 400μl BHI Lichid. Pentru Lichid, 500 μl D + 500 μl R.

În cazul experimentelor de conjugare la tulpini de *A. baumannii* izolate din infecții intraspitalicești și din mediu au fost preparate patru medii de cultură respectiv, BHI (Brain heart infusion), simplu, cu adaos de rifampicină (Rif), cu meropenem (MEM) precum și mediu cu ambele antibiotice (Rif și MEM) (protocolul 3). Concentrația finală a RIF a fost 250mg/L iar concentrația finală a MEM, 1μg/ml. Tulpina care are rolul de acceptor în cazul tulpinilor de *A. baumannii* (A) (*A. baylyi* ADP1) care prezintă rezistență la Rifampicină.

Etapele conjugării:

a. Liquid Mating – Conjugarea în mediu lichid.

Pentru realizarea acestui experiment se vor utiliza culturi bacteriene care au fost incubate pentru 24 h.

Ziua 1:

1. Se realizează suspensii bacteriene – 1 ansă de cultură suspendată în 1 ml mediu lichid

(Nutrient Broth).

2. Se incubează cu agitare, 24 h la 37°.

Ziua 2:

3. Se realizează suspensii în mediu lichid de densitate 2 MF atât din D cât și din A.

4. Se transferă 500μl suspensie D și 500μl suspensie A peste 4 ml mediu lichid.

5. Se incubează fără agitare, 24 h la 37°.

Ziua 3:

6. Se realizează diluții zecimale din fiecare tub (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

7. Din fiecare diluție se va însămânța în spot (25μl) pe mediul MacConkey cu azida de sodiu și imipenem.

a. **Filter Mating** – Conjugare pe mediu solid.

Pentru realizarea acestui experiment se vor utiliza culturi bacteriene care au fost incubate pentru 24 h.

Ziua 1:

1. Se realizează suspensii bacteriene – 1 ansa de cultură suspendată în 1 ml mediu lichid (Nutrient Broth).

2. Se incubează cu agitare, 24 h la 37°.

Ziua 2:

3. În 700 μl mediu lichid (Nutrient Broth) se adaugă 100 μl suspensie din fiecare cultură D și 200 μl cultura R.

4. Se centrifughează 6000 rpm, 7 minute.

5. Se aruncă supernatantul, se resuspendă în 200 μl mediu lichid și se vortexează bine.

6. Se așează filtrele pe mediul solid neselectiv (Nutrient Agar) pe care se vor însămânța 100 μl din suspensia obținută anterior.

7. După ce suspensia se absoarbe în filtru, se incubează 24 h la 37 °.

Ziua 3:

8. Se resuspenda culturile crescute pe filtre în 1ml AFS, se vortexează bine.

9. Se realizează diluții zecimale din fiecare tub (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

10. Din fiecare diluție se va însămânța în spot (25μl) pe mediul MacConkey cu azida de sodiu și imipenem.

Dacă rezultatul experimentului este unul pozitiv, se vor pasa transconjuganții (tulpinile de *E. coli* J53 în care au fost transferate elementele genetice mobile cu gena/genele de rezistență la antibiotice) pentru a doua oara pe mediu solid MacConkey cu azidă de sodiu și imipenem pentru a ne asigura că selectăm doar tulpina de interes. Ulterior, se vorpasa tulpinile pe mediu neselectiv și se va realiza extracția ADN și de asemenea, vor fi pasate și pe medii de conservare (recomandat de

O.M.S).

REZULTATE

Activitățile 2.1.-2.4.

Activitățile **2.1** - secvențierea unor gene implicate în rezistență la antibiotice, **2.2** - secvențierea NGS a unor plasmide purtătoare de gene de rezistență; **2.3** - secvențierea NGS a unor genomuri de tulpini bacteriene rezistente la antibiotic și **2.4** - asamblarea și adnotarea plasmidelor și genelor de rezistență obținute prin secvențiere NGS au fost realizate prin efectuarea experimentelor de secvențiere NGS.

Pentru tulpinile de enterobacterii a fost investigată prezența genelor de rezistență la carbapeneme și a genelor de AR ce conferă fenotip BLSE: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}. Tulpinile din mediu izolate pe medii selective cromogene (CHROMID® CARBA, CHROMID® OXA-48, CHROMID® ESBL) au fost confirmate prin investigarea prezenței genelor de rezistență la antibioticele β-lactamice.

Experimentele de simplex și multiplex PCR la tulpinile de *Enterobacteriaceae* au evidențiat prezența genei *bla*_{SHV} la 8 dintre cele 12 tulpini analizate (66,66%), *bla*_{NDM-1} la 7 tulpini (58,33%), *bla*_{OXA-48} la 5 tulpini (41,66%), *bla*_{TEM} și *bla*_{KPC} la 4 tulpini (33,33%), *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SIM} nefiind detectate la niciuna dintre tulpinile analizate (Tabelul 4).

Tabelul 4. Rezultatele experimentelor PCR efectuate pentru tulpinile de *Enterobacteriaceae*.

Codul tulpinii	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{SIM}
8 <i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
18011 CK1 <i>E. kobei</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	-
18003 CK7 <i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-
18002 CK10 <i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-
13 Kpn <i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	-
18004 CK2 <i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	-
19006 EE1 <i>E. coli</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
18008 CK4 <i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-
18007 CK3 <i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-
18007 CK4 <i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-
18007 CK5 <i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-
18002 CK5 <i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-

Experimentele de simplex și multiplex PCR în cazul celor 12 tulpini de *A. baumannii* au evidențiat prezența genei *bla*_{OXA-51} la 12 dintre cele 12 tulpini analizate (100%), *bla*_{OXA-23} la 9 tulpini

(75%), *bla*_{OXA-23}, *bla*_{SHV} și *bla*_{VEB} la 4 tulpini (33,33%), *bla*_{TEM}, *bla*_{NDM-1} și *bla*_{VIM} la o tulpina (8.33%), *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SIM} și *bla*_{KPC} nedând detectate la niciuna dintre tulpinile analizate (Tabelul 5).

Tabelul 5. Rezultatele experimentelor PCR efectuate pentru tulpinile de *A. baumannii*.

Codul tulpinii	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{VEB}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{SIM}
BL18Abc	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19011 CNE6 Abc	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
13 Abc (F)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29=80 Abc Trg	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
50=19014 CNE4 Abc	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
64=19014 ENE4 Abc	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30=19052 ENE2 Abc	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34=DF 0965 Abc	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4=19037 CNE6 Abc	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
5=IS Abc 26F	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31C1 Abc EF	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
BL6 Abc	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ulterior reacțiilor PCR, au fost demarate **activitățile de secvențiere**. Activitatea 2.1 a fost efectuată atât pentru tulpinile de *Enterobacteriaceae* cât și pentru tulpinile BGNF (un total de 2 tulpini), în timp ce activitățile 2.2, 2.3 și 2.4 doar pentru tulpinile de *Enterobacteriaceae* (3 tulpini bacteriene). În cazul unui număr de șase tulpini incluse în studiu s-a realizat **secvențiere pair-end whole genome sequencing** – *MiSeq System Sequencer*, Illumina.

Din **analiza bioinformatică a produșilor de secvențiere** în ceea ce privește prezența genelor de rezistență la antibiotice s-a evidențiat faptul că tulpinile analizate prezintă gene de rezistență pentru un număr ridicat de clase de antibiotice (între 4 și 8 clase). Cele mai multe gene de rezistență au fost evidențiate la tulpinile de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* și *E. coli* (Tabelul 6).

Tabelul 6. Rezultatul analizei tulpinilor secvențiate (ResFinder); Aminogl = Aminoglicozide; β -lactam = β -lactamice; Fluoroch = Fluorochinolone; Fosfom = Fosfomicină; Sulfonam = Sulfonamide; Trimeto = Trimetoprim; Tetrac = Tetraciclina;

Cod tulpină	Rezistență la antibiotice								
	Aminogl	β - lactam	Fluoroch	Fosfom	Fenicol	Sulfonam	Trimeto	MLS	Tetrac
18008CK4 <i>K. pneumoniae</i> AR pentru 7 clase antibiotice	aadA2 rmtC	bla _{OXA-48} bla _{NDM-1} bla _{SHV-like}	oqxB oqxA	fosA	catA1	sul1	dfrA12	-	-
18007CK4 <i>K. pneumoniae</i> AR pentru 8 clase antibiotice	aph(3'')-Ib aph(3')-Via aph(6)-Id armA rmtC	bla _{ADC-25} bla _{KPC-3} bla _{NDM-1} bla _{OXA-23} bla _{OXA-66} bla _{SHV-106/28}	oqxA oqxB qnrB19	fosA	catA1	sul1	-	mph(E) msr(E)	tet(B)
18008CE1 <i>E. coli</i> AR pentru 6 clase antibiotice	aac(3)-Ia aac(6')-Ib-cr aph(3')-Ia aadA1 aac(3)-Iia rmtC	bla _{KPC-2} bla _{TEM-1B} bla _{NDM-1} bla _{OXA-1}	qnrB19 aac(6')-Ib-cr		catB3 catA1	sul1 sul2			tet(D)
32C1Abc (EF) <i>A. baumannii</i> AR pentru 8 clase antibiotice	aac(6')-Ib-cr AAC(6')-Iia aph(3')-Via aph(3')-Ia rmtC ANT(3'')-Iib aph(6)-Id aph(3'')-Ib	bla _{NDM-1} bla _{OXA-66} bla _{ADC-25} bla _{ADC-19} bla _{OXA-23} bla _{SHV-67} bla _{OXA-15}	aac(6')-Ib-cr qnrB1 oqxB oqxA	fosA	catA1 catB4	sul1	dfrA14 dfrA5		tetA tetB tetR
BL 6 Abc <i>A. baumannii</i> AR pentru 4 clase antibiotice	aph(6)-Id aph(3')-Via aph(3'')-Ib aac(3)-Ia aac(6')-Ip aadA8b	bla _{OXA-66} bla _{ADC-25} bla _{TEM-1D} bla _{OXA-72}				sul2 sul1			tet(B)

În ceea ce privește **prezența plasmidelor asociate cu AR** pentru tulpinile de *Enterobacteriaceae* (Tabelul 7), a fost evidențiată prezența a 8 tipuri de plasmide (ColE10, IncA/C2, IncFIB(K), IncFII(Yp), IncHI1A(CIT), IncHI1B(CIT), IncP6, IncX1) în cazul tulpinii de *E. coli* (18008 CE1), 5 (Col440II, ColRNAI, IncFII(K), IncFII(Yp), IncR) și respectiv 3 tipuri (ColpVC, IncFII(Yp), IncL/M (pOXA-48)) pentru tulpinile de *K. pneumoniae* (18007CK4 și 18008CK4).

Tabelul 7. Plasmidele asociate cu gene de AR

Database Plasmid finder	Tulpina	Plasmide	Identitate %	Q/T	Contig	Poziție in contig	Note
<i>Enterobacteriaceae</i>	18008CE1	ColE10	99.44	177 / 177	N_226 length_9660 cov_105.64	6569..6745	
		IncA/C2	100	417 / 417	N_78 length_30980 cov_40.77	8079..8495	
		IncFIB(K)	99.11	560 / 560	N_307 length_6359 cov_44.87	4587..5146	Kpn3
		IncFII(Yp)	99.13	230 / 230	N_127 length_18889 cov_47.67	12088..12317	Yersenia
		IncHI1A(CIT)	100	420 / 420	N_2 length169961 cov_38.05	121477..121896	pNDM-CIT
		IncHI1B(CIT)	99.07	538 / 538	N_2 length_169961 cov_38.05	57708..58245	pNDM-CIT
		IncP6	99.88	806 / 806	N_176 length_13653	8778..9583	

					cov_116.86		
		IncX1	100	374 / 374	N_318 length_6104 cov_36.06	1958..2331	
	18007CK4	Col440II	99.29	282 / 282	N_302 length_4750 cov_252.40	3672..3953	
		ColRNAI	100	130 / 130	N_184 length_9421 cov_183.58	729..858	
		IncFII(K)	97.97	148 / 148	N_73 length_22056 cov_37.95	17032..17179	
		IncFII(Yp)	99.13	230 / 230	N_29 length_55017 cov_50.51	6415..6644	Yersenia
		IncR	100	251 / 251	N_79 length_20183 cov_36	14583..14833	
	18008CK4	ColpVC	98.45	193 / 193	N_62 length_2185 cov_1524.25	511..703	
		IncFII(Yp)	99.13	230 / 230	N_44 length_21910 cov_54.91	6414..6643	Yersenia
		IncL/M (pOXA-48)	100	661 / 661	N_34 length_40779 cov_36.31	31870..32530	pOXA-48

Prin analiza bioinformatică a celor 3 tulpini de *Enterobacteriaceae* secvențiate (NGS), a fost evidențiată apartenența acestora la diferite clone bacteriene (prin analiza schemei MLST) (Tabel 8) și prezența genelor de virulență. Tulpinile de *K. pneumoniae* aparțin clonelor ST101 (18007 CK4) și respectiv ST383 (18008CK4), iar tulpina de *E. coli* are drept cel mai apropiat rezultat clona 378 (18008 CE1).

Tabelul 8. Profiluri MLST obținute la tulpinile de *Enterobacteriaceae* analizate.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Escherichia coli</i>			
Cod tulpina		18007CK4	18008CK4			18008CE1 vs ecoli2#	
Gene utilizate pentru identificarea ST-ului	gapA	Identitate	100	100	dinB	Identitate	100
		Coverage	100	100		Coverage	100
		Alelă	gapA_2	gapA_2		Alelă	dinB_58
	infB	Identitate	100	100	icdA	Identitate	100
		Coverage	100	100		Coverage	100
		Alelă	infB_6	infB_6		Alelă	icdA_156
	mdh	Identitate	100	100	pabB	Identitate	100
		Coverage				Coverage	100

		100	100			
	Alelă	mdh_1	mdh_1		Alelă	pabB_110
pgi	Identitate	100	100	polB	Identitate	100
	Coverage	100	100		Coverage	100
	Alelă	pgi_5	pgi_3		Alelă	polB_17
phoE	Identitate	100	100	putP	Identitate	100
	Coverage	100	100		Coverage	100
	Alelă	phoE_4	phoE_8		Alelă	putP_16
rpoB	Identitate	100	100	trpA/trpB	Identitate	99.82/99.83
	Coverage	100	100		Coverage	100
	Alelă	rpoB_1	rpoB_1		Alelă	trpA_31*/trpB_112*
tonB	Identitate	100	100	uidA	Identitate	100
	Coverage	100	100		Coverage	100
	Alelă	tonB_6	tonB_18		Alelă	uidA_40
ST type		101	383	ST type		378*

Notes: * alleles with less than 100% identity found; * trpA: Novel allele, ST may indicate nearest ST; * trpB: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

Toxin finder: 18008CE1: E. coli: gad (identity 100, Query / Template length: 1401/1401; Contig: NODE_144_length_17077_cov_21.018761; Position in contig: 1845..3245; Protein function: Glutamate decarboxylase.

Rezultatul secvențierii tulpinii 18008 CK4 a evidențiat **prezența unei plasmide de tip IncL/M(pOXA-48)** într-un contig care are o dimensiune de 40778 pb. Acest rezultat este în concordanță cu prezența genei de rezistență *bla*_{OXA-48} la această tulpină. Adnotarea acestui contig a scos în evidență prezența unor gene precum: transpozaze, metiltransferaze, gene de tip Mob, Nik, Tra, Rep, Trb, conjugal transfer protein si a secvențelor de inserție ca de exemplu IS4, etc (Figura 5).

Tra-CbiX-KlcA-ssDNAbind-MobC-NikA-TraH-CTP-TraJ-TraK-CTP-TraO-TraP-CTP-CTP-TraX-DotA-RepC-RepA-TrbC-TrbB-TrbA-IS4

Figura 5. Succesiunea de gene adnotate în contigul determinat ca fiind parte a unei plasmide de tip IncL/M(pOXA-48) cu o dimensiune de 40778 pb. Tra = transpozază, CbiX = cobalamin biosynthesis protein, CTP = conjugal transfer protein, DotA = type IV secretion protein, Rep = replicase.

În cazul tulpinii 18007 CK4 a fost evidențiată prezența unei **plasmide de tip IncFII(K)** într-un

contig care are o dimensiune de 22056 pb. Adnotarea acestui contig a scos în evidență prezența genei *bla*_{KPC-3} și a unor gene precum: DUF 305/2913/2726, AAA family ATPase, Tyrosine-type recombinase-integrase, Rep, Fin, Tra și secvențe de inserție precum IS1182, ISAs1-like, IS21, IS3 (Figura 6).

DUF305-IS1182-ISKpn31-ISKpn6-BlaKPC-3-AA AfamATPase-IS21-Tn4401-DUF2913-RepA-RepA-Tap-RepA-DUFF2726-FinO-TraX

Figura 6. Succesiunea de gene adnotate în contigul determinat ca fiind parte a unei plasmide de tip IncFII(K) cu o dimensiune de 22056 pb. Tra = transpozază, FinO = fertility inhibitor protein, TraX = type F conjugative transfer pilin acetylase, DUF = domain containing protein, Rep = replicase, replication regulatory protein, Tap = RepA leader peptide.

Rezultatele experimentelor de conjugare

Rezultatele experimentelor de conjugare efectuate atât pe mediu solid, cât și pe mediu lichid și tulpinile selectate și caracteristicile acestora sunt prezentate în tabelele 9 și 10.

Tabelul 9. Tulpinile bacteriene selectate pentru experimentele de conjugare.

	Codul tulpinii	Sursa izolare	Markeri genetici de AR
Protocol 1			
D	8 <i>K. pneumoniae</i>	Clinică	NDM-1, OXA-48, CTX-M
	18011CK1 <i>E. kobei</i>	Mediu	TEM, KPC, CTX-M
	18003CK7 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, CTX-M, OXA-10, SHV-26, CMY-4
	18002CK10 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, CTX-M15, OXA-10, CMY-4, SHV-26
	13Kpn <i>K. pneumoniae</i>	Clinică	OXA-1, SHV-28, OXA-48, TEM-1A
	18004CK2 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	SHV-28, OXA-48, CTX-M
	19006EE1 <i>E. coli</i>	Mediu	TEM-1A, CTX-M15
R	J53 <i>E. coli</i>	-	F met pro Azi ^r
Protocol 2			
D	18003 CK7 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, CTX-M, OXA-10, SHV-26, CMY-4
	18011 CK1 <i>E. kobei</i>	Mediu	TEM, KPC, CTX-M
	18008 CK4 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, OXA-48, SHV-26-like
	18007 CK3 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	TEM-1B, OXA-9, OXA-1, OXA-48, CTX-M-15
	18007CK4 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, KPC, SHV
	18002 CK10 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, CTX-M15, OXA-10, CMY-4, SHV-26
	18007 CK5 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, KPC-3, SHV-28-like
	18002 CK5 <i>K. pneumoniae</i>	Mediu	NDM-1, KPC, SHV
R	J53 (control) <i>E. coli</i>		F–met pro Azir
Protocol 3			
D	BL18Abc <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-23, OXA-51
	19011 CNE6 Abc <i>A. baumannii</i>	Mediu	VIM, OXA-23, OXA-51, SHV
	13 Abc (F) <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-23, OXA-51
	29=80 Abc Trg <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-23, OXA-51, VEB, TEM

	50=19014 CNE4 Abc <i>A. baumannii</i>	Mediu	OXA-23, OXA-51, VEB,
	64=19014 ENE4 Abc <i>A. baumannii</i>	Mediu	OXA-23, OXA-24, OXA-51
	30=19052 ENE2 Abc <i>A. baumannii</i>	Mediu	OXA-51
	34=DF 0965 Abc <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-24, OXA-51, VEB, GES
	4=19037 CNE6 Abc <i>A. baumannii</i>	Mediu	OXA-23, OXA-51, SHV
	5=IS Abc 26F <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-23, OXA-51,
	32C1Abc (EF) <i>A. baumannii</i>	Mediu	NDM-1, OXA-23, OXA51, SHV
	BL 6 Abc <i>A. baumannii</i>	spital	OXA-24, OXA-51
R	ADP1 (control) <i>A. baylyi</i>		Rezistent la rifampicină (RifR)

Tabelul 10. Rezultatele experimentelor de conjugare.

Cod	Conjugare pe mediu solid	Conjugare pe mediu lichid
8 <i>K. pneumoniae</i>	pozitiv	negativ
18011CK1 <i>E. kobei</i>	pozitiv	pozitiv
18003CK7 <i>K. pneumoniae</i>	pozitiv	negativ
18002CK10 <i>K. pneumoniae</i>	negativ	negativ
13Kpn <i>K. pneumoniae</i>	pozitiv	negativ
18004CK2 <i>K. pneumoniae</i>	pozitiv	negativ
19006EE1 <i>E. coli</i>	negativ	negativ
J53 <i>E. coli</i>	negativ	negativ
18003 CK7	Pozitiv	Pozitiv
18011 CK1	Pozitiv	Pozitiv
18008 CK4	Pozitiv	Pozitiv
18007 CK3	Pozitiv	Pozitiv
18007CK4	Pozitiv	Pozitiv
18002 CK10	Pozitiv	Pozitiv
18007 CK5	Pozitiv	Negativ
18002 CK5	Pozitiv	Pozitiv
J53 (control)	Negativ	Negativ
BL18Abc	Negativ	Negativ
19011 CNE6 Abc	Negativ	Negativ
13 Abc (F)	Pozitiv	Negativ
29=80 Abc Trg	Negativ	Negativ
50=19014 CNE4 Abc	Negativ	Negativ
64=19014 ENE4 Abc	Pozitiv	Negativ
30=19052 ENE2 Abc	Negativ	Negativ
34=DF 0965 Abc	Pozitiv	Negativ
4=19037 CNE6 Abc	Negativ	Negativ
5=IS Abc 26F	Negativ	Negativ
32C1Abc (EF)	Negativ	Negativ
BL 6 Abc	Negativ	Negativ
ADP1 (control)	Negativ	Negativ

Activitatea 2.5. Studii de conformație și interacțiune a proteinelor codificatoare pentru gene de rezistență la antibiotice

Întrucât în urma secvențierilor nu au fost identificate alele noi pentru genele de rezistență la antibiotice identificate la tulpinile analizate, studiile de conformație au arătat conformații ale

uzata pe medii selective: CHROMID[®] CARBA, CHROMID[®] OXA-48, CHROMID[®] ESBL).

Tulpinile analizate au prezentat între 1 și 4 gene de rezistență la antibioticele β -lactamice, codificatoare pentru ESBL și/sau carbapenemaze. Experimentele de simplex și multiplex PCR la tulpinile de *Enterobacteriaceae* au evidențiat prezența genei *bla_{SHV}* la 8 dintre cele 12 tulpini analizate (66,66%), *bla_{NDM-1}* la 7 tulpini (58,33%), *bla_{OXA-48}* la 5 tulpini (41,66%), *bla_{TEM}* și *bla_{KPC}* la 4 tulpini (33,33%), *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SIM}* nedând detectate la niciuna dintre tulpinile analizate. În cazul celor 12 tulpini de *A. baumannii* a fost evidențiată prezența genei *bla_{OXA-51}* la 12 dintre cele 12 tulpini analizate (100%), *bla_{OXA-23}* la 9 tulpini (75%), *bla_{OXA-23}*, *bla_{SHV}* și *bla_{VEB}* la 4 tulpini (33,33%), *bla_{TEM}*, *bla_{NDM-1}* și *bla_{VIM}* la o tulpină (8.33%), *bla_{CTX-M}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SIM}* și *bla_{KPC}* nedând detectate la niciuna dintre tulpinile analizate

Pentru cele șase tulpini supuse secvențierii (respectiv două tulpini de *K. pneumoniae*, două tulpini de *A. baumannii*, o tulpină de *E. coli* și o tulpină de *E. kobei* (*pair-end whole genome sequencing* - *MiSeq System Sequencer*, Illumina) s-a demonstrat apartenența acestor tulpini la categoria de bacterii multirezistente la antibiotice (MDR). Astfel, analiza bioinformatică a produșilor de secvențiere a relevat prezența genelor de rezistență pentru 4-8 clase de antibiotice, cele mai multe gene fiind evidențiate la tulpinile de *A. baumannii* (8 clase), urmate de cele de *K. pneumoniae* (7 clase). Majoritatea tulpinilor de *Enterobacteriaceae* și 3 dintre tulpinile de *Acinetobacter baumannii* incluse în experimentele de conjugare s-au dovedit a fi tulpini conjugative, cea mai mare parte a lor conjugând cu precădere pe mediu solid (filtru). Studiile conformaționale au indicat conformații ale proteinelor codificate de respectivele alele identice cu cele existente în bazele de date internaționale.

Deplasări realizate pe parcursul derulării proiectului

- **Deplasare echipa chineză** (director proiect: Wang Xiaohui, membrii echipei: Zong Zhiyong, Feng Yu, Liu Lina) în România: 31.05-11.06.2019

În cadrul acestei vizite a echipei chineze la ICUB s-au stabilit protocoalele de urmat în cadrul proiectului și de asemenea au fost selectate tulpinile de analizat. De asemenea, s-a realizat instruirea echipei române de către echipa chineză cu privire la realizarea experimentelor de conjugare bacteriană și selectare a transconjuganților, dar și în ceea ce privește analiza bioinformatică a datelor, respectiv asamblarea și adnotarea primară și detaliată a genomurilor bacteriene și compararea acestora.

- **Deplasare echipa română** (membrii echipei: A.C. Ilda Barbu, CS Marius Surleac, drd. Laura Ioana Popa, lect dr. Irina Gheorghe) în China - Chengdu: 15-28.09.2019

În cadrul acestei vizite au fost realizate experimente de conjugare bacteriană, selectare a transconjuganților și analiză a acestora, secvențierea unor genomuri bacteriene de interes și analizarea datelor.

De asemenea, echipa română a participat la un *workshop* organizat de instituția gazdă (Universitatea Sichuan, prof. dr. Zong Zhiyong) referitor la *bioinformatica asamblării și adnotării de genomuri bacteriene*.

Diseminarea rezultatelor

Articole ISI

- Mitache M.M., Banu O., Borcan E., Gheorghe I., Marutescu M., Popa M., Predescu M., Rusu E., Nemes R., Chifiriuc M.C. Resistance and Virulence Patterns in Gram Negative and Gram Positives Rods Isolated from the Hospital Environment in Bucharest, Romania. *Revista De Chimie* 69 (11). 4026-4032

Articole (BDI)

- Podgoreanu P., Negrea S., Buia R., Delcaru C., Trusca S.B., Lazar V., Chifiriuc M.C. 2019. Alternative strategies for fighting multidrug resistant bacterial infections. *Biointerface Research In Applied Chemistry* 9(1). 3834-3841
- Popa L.I., Czobor Barbu I., Chifiriuc M.C. 2018. Mobile genetic elements involved in the horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 77(4), 263-276.
- Vrâncianu O., Chifiriuc M.C. 2018. Exploiting the bacterial adaptive immunity to develop new antisense – based strategies to combat antibiotic resistance. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 77 (1), 7-15.

Participări la conferințe internationale

- Gheorghe I.; Czobor I; Avram I.; Alshaiqli N.; Pircalabioru-Gradisteanu G.; Negut A.C.; Marutescu L.; Lazar V.; Chifiriuc M.C. P0936. Genetic background of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from a wastewater treatment plant near Bucharest, Romania. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, from 13 - 16 Aprilie 2019.
- Cristea V.C., Angelescu M.C., Gheorghe I., Popa L.I., Czobor I., Ispas I., Grigore G.A., Bucatariu I., Marutescu L., Popa M., Lazar V., Popa I.M., Chifiriuc M.C. P1480. Snapshot of virulence and resistance markers in *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from ambulatory patients. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, from 13 - 16 April 2019.
- Czobor Barbu I., Popa L.I., Gheorghe I., Sârbu I., Neguț A., Grădișteanu G., Lazăr L., Chifiriuc M.C. Molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from wastewater treatment plant samples in Romania. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam,

Netherlands, from 13 - 16 Aprilie 2019.

- Czobor Barbu I., Sârbu I., Gheorghe I., Popa L.I., Neagu A., Măruțescu L., Popa M., Grădișteanu G., Lazar V., Chifiriuc M.C. Detection of the epidemic IncP6 plasmid carrying blaKPC-2 in a multidrug resistant *Enterobacter kobei* isolate from activated sludge of a wastewater treatment plant in Vâlcea County, Romania. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, from 13 - 16 Aprilie 2019.
- 3 abstracte vor fi submise la 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, Franța, 18 - 21 aprilie 2020.

Bibliografie

1. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. 2012, SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*;19: 455-477.
2. Bogaerts P., Rezende de Castro, R de Mendonca, Huang T-H., Denis Q., Glupczynski Y. 2013. Validation of carbapenemase and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Multiplex Endpoint PCR Assays according to ISO15189. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68:1576-1582.
3. Carattoli A., Zankari E., ...García-Fernández A., 2014, In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(7): 3895–3903;
4. Eftekhari F., Mazinani S.M., Ghandili S., Hamraz M., Zamani S., 2005, PCR detection of plasmid mediated TEM, SHV and AmpC β -lactamases in community and nosocomial urinary isolates of *Escherichia coli*, *Iranian journal of biotechnology*, 3(1), 48, 54.
5. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs C, et al. 2001, GES-2, a class A β lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2598-2603.
6. McArthur et al, 2013, The comprehensive Antibiotic Resistance Database, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 3348-3357.
7. Moura A., Soares M., Pereira C., Leitão N., Henriques I., Correia A., 2009, INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*. 25: 1096–1098;
8. Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas ME, Karim A, and Nordmann P. 2001, VEB1-like extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis*; 7:468- 470
9. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs C, et al. 2001, GES-2, a class A β lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2598-2603.
10. Poirel L., Nass T., Nicolas D., Collet L., Bellais S., Cavallo J.D., 2000, Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid – an integron- borne gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 44, 891- 897.
11. Siguier P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., Chandler M., 2006, Isfinder: the reference center for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34; D32-D36 (link pubmed) and the database URL (<http://www-is.biotoul.fr>);
12. 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.
13. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303 (2018).
14. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
15. <http://www.genomicepidemiology.org/>
- 16 <http://ecdc.europa.eu/> - European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018