

**Rezultatele Proiectului Nucleu**  
**Creșterea capacității de intervenție și răspuns în infecțiile produse de germeni**  
**emergenți, re-emergenți și cu rezistență la antimicrobiene, ca sprijin pentru**  
**clinică și sănătatea publică**  
**Cod PN 22 44 03 01,**  
**pentru anul 2023**

În cadrul **fazei 1 /2023** "Optimizarea protocoalelor de diagnostic specific și selecția tulpinilor luate în studiu", s-au desfășurat următoarele activități:

1. Verificarea în condițiile laboratorului IRV a diagnosticului rapid al infecțiilor determinate de virusuri respiratorii (rujeolei, rubeolei SARS-CoV-2), prin detecția moleculară (metoda *real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR), folosind truse comerciale (exp. kit „Allplex SARS-CoV-2 fast PCR Assay”) sau metode ”in house”, în vederea stabilirii adecvării metodei la scop. **Metoda** de testare a fost reprezentată de metoda moleculară de diagnostic *in vitro*, Real Time RT-PCR, interpretarea rezultatului fiind făcută calitativ (pozitiv/negativ) și prin citirea valorii *thresholdului* (ciclul la care curba de amplificare trece peste nivelul de bază calculat). Metoda identifică 3 fragmente specifice virale și un fragment din gena umană (Rnază P umană) folosit drept control intern endogen de reacție.

**Parametri de performanță și criteriile de acceptare a validării metodei:**

Coeficientul de variație (CV) =  $s/M \times 100$ , unde: s - abaterea standard, M - media.

- specificitate – s-au testat probe cunoscute ca fiind pozitive pentru prezența virusului rujeolei și virusurilor gripale pentru a verifica dacă metoda răspunde într-un mod unic la analitul cerut: specificitate de minim 90% (ținând cont de existența unor probe cu cantitate mică de ARN sau incerte) în determinările anterioare;
- precizie intra-determinare = repetabilitate - coeficientul de variație CV% <10% - s-au testat un număr de 6 determinări din pool pozitiv și 6 determinări din pool negativ, toate lucrute într-o reacție, în aceeași zi, un operator;
- precizie inter-determinări = reproductibilitate - coeficientul de variație CV% <10% - s-au testat un număr de 6 determinări din pool pozitiv și 6 determinări din pool negativ, lucrute în alte două zile/ședințe de reacție, alți operatori.
- robustețe = s-au testat un număr de 12 determinări din pool pozitiv la care s-a modificat parametrul volum (+10% și -10%), pentru a monitoriza efectele provocate de posibilele erori în pipetarea probei inițiale. S-au testat un număr de 12 determinări din pool pozitiv și 12 determinări din pool negativ pe 3 sisteme Real Time diferite. Coeficientul de variație CV% <10%.
- limita minimă de detecție – s-a testat controlul pozitiv în diluții. Coeficientul de variație CV% <10% pentru determinări a ultimei diluții pozitive ( $10^{-4}$ ) a controlului pozitiv.

**Probele biologice**

- Pool pozitiv obținut din probe reprezentate de fragmente necroptice umane (fragmente de pulmon) recoltate în mediu de transport pentru virusuri care au fost pozitive la detecția virusului SARS-CoV-2.
- Pool negativ obținut din probe reprezentate de fragmente necroptice umane (fragmente de pulmon) recoltate în mediu de transport pentru virusuri care au fost negative la detecția virusului SARS-CoV-2.
- Probe pozitive virus gripal (552977, 552979, 553395) pentru testarea specificității.
- Probe pozitive virus rujeolei (556818, 556819) pentru testarea specificității.

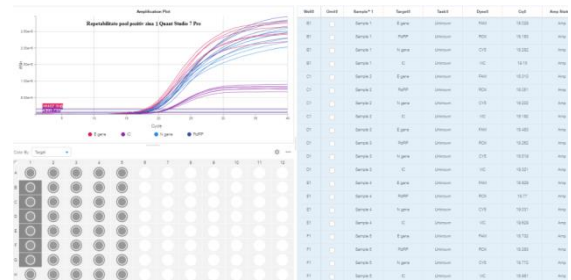
- **Parametrul specificitate** a fost determinat prin testarea a 5 probe pozitive pentru alte virusuri respiratorii (virus gripal și virus rujeolos) cu kitul pentru detecția virusului SARS-CoV-2. Rezultatul testărilor a fost negativ (Ct=NoCt) rezultând o specificitate de 100%.
- **Parametrul precizie intra-determinare (repetabilitate)**, a fost determinat prin testarea a 6 replici ale poolului pozitiv respectiv poolului negativ, în aceleași condiții, cu același echipament, reactivi, operator, se notează Ct obținut și se calculează coeficientul de variație %CV.

Coeficientul de variație obținut a fost sub limita de 10% pentru toate valorile Ct ținând cont de sistemul de amplificare folosit, sedința de lucru.

Pentru Pool Negativ de fiecare dată rezultatul a fost negativ (Ct=NoCt).

A rezultat o concordanță de 100% în urma repetării testărilor.

*Repetabilitatea rezultatelor pe sistemul de amplificare QuantStudio7.*



- **Parametrul precizie inter-determinări (reproductibilitate)**, a fost determinat prin testarea poolului pozitiv, respectiv negativ, în cadrul a trei experimente diferite (3 zile diferite), se notează Ct obținut și se calculează coeficientul de variație %CV.

Coeficientul de variație obținut a fost sub limita de 10% pentru toate valorile Ct.

Pentru Pool Negativ de fiecare dată rezultatul a fost negativ (Ct=NoCt).



*Reproductibilitatea rezultatelor pe sistemul de amplificare QuantStudio7.*

- **Parametrul robustețe** a fost determinat prin:

- testarea poolului de probe pozitiv respectiv negativ, în cadrul a trei experimente diferite, folosind volum de proba 200μl, 220μl și 180μl, se calculează coeficientul de variație %CV (tabelul a).
- testarea celor două pool-uri pe 3 sisteme diferite de real time, se calculează coeficientul de variație %CV (tabelele b și c).

- a) Volumul inițial al probei diferit

	Deviația standard	Media	%CV
Gena E	0,44	18,72	2,38
Gena RdRp	0,38	18,55	2,06
Gena N	0,38	18,79	2,00



*Robustețe-volum inițial de proba diferit*

- b) Rezultate obținute neținând cont de sistemul de amplificare

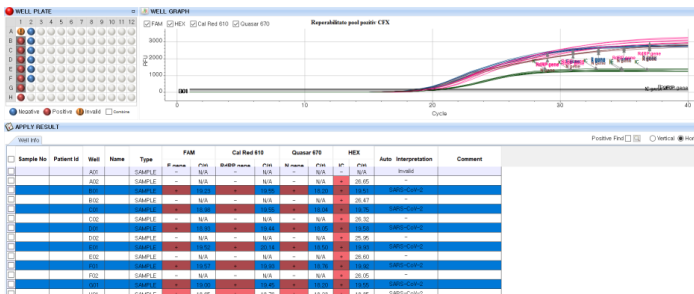
	Deviația standard	Media	%CV
Gena E	0,82	18,74	4,39
Gena RdRp	0,79	19,62	4,02
Gena N	0,41	18,75	2,17

- c) Rezultate obținute indiferent de volumul probei sau de sistemul de amplificare folosit

	Deviația standard	Media	%CV
Gena E	0,73	18,77	3,91
Gena RdRp	0,81	19,35	4,18
Gena N	0,40	18,79	2,11

Coeficientul de variație obținut a fost sub limita de 10% pentru toate valorile Ct.

Pentru Pool Negativ de fiecare dată rezultatul a fost negativ (Ct=NoCt).



*Robustețe pe sistemul de amplificare Quant Studio5*

- **Parametrul limită de detecție**, a fost = %CV pentru determinări ale diluțiilor  $10^{-4}$  a controlului pozitiv.

Ultima diluție pozitivă ( $10^{-4}$ ) controlului pozitiv a fost testată de 10 ori pentru a determina coeficientul de variație.

**Parametrul limită de detecție** pentru determinări în diluție a controalelor pozitive

Valorile Ct înregistrate pentru diluțiile  $10^{-1}$  până la  $10^{-8}$  a controlului pozitiv

Ct				
Diluția	gena E	gena RdRp	gena N	
10-1	20,9	20,3	21	
10-2	24,4	23,9	24,7	
10-3	27,9	27,9	28,2	
10-4	32,4	35,3	32,4	
10-5	No ct	No ct	No ct	
10-6	No ct	No ct	No ct	
10-7	No ct	No ct	No ct	
10-8	No ct	No ct	No ct	



Valorile Ct obținute pentru ultima diluție pozitivă și %CV pentru 10 determinări a acesteia.

Ct				
Diluția	gena E	gena RdRp	gena N	
$10^{-4}$	28,9	29,8	37,5	
$10^{-4}$	30,2	30,6	33,3	
$10^{-4}$	29	31,4	32,1	
$10^{-4}$	29,5	31,9	30,8	
$10^{-4}$	29,5	31,3	31,2	
$10^{-4}$	29,1	30,2	29,3	
$10^{-4}$	28,6	30,7	29,5	
$10^{-4}$	30,3	35,9	31,5	
$10^{-4}$	30,4	31,3	30,9	
$10^{-4}$	34,8	29,4	31,3	



	Deviatia standard	Media	%CV
Gena E	1,79	30,03	5,96
Gena RdRp	1,81	31,25	5,79
Gena N	2,45	31,83	7,70

La diluția  $10^{-4}$  toate determinări au fost pozitive. Coeficientul de variație obținut a fost sub limita de 10% pentru toate valorile Ct.

2. Un alt obiectiv a fost reprezentat de gasirea de noi terapii alternative in tratarea infectiilor produse de enterovirusuri. S-a realizat titrarea virusului Coxsackie B -TCID50 -  $10^8$ , evaluarea efectului citotoxic al UE, controlul interferentei virusului cu linia celulara si testarea efectului antiviral al Uleiurilor Esențiale (UE) de oregano, scortisoara si eucalipt

Uleiurile esențiale (UE) derivate din plante sunt amestecuri de diferiți compuși lipofili, cu molecula scăzuta, aromatici, volatili. Numeroase studii in vitro și in vivo au arătat că UE prezintă proprietăți

biologice diferite: antimicrobiene, antioxidante, efecte imunomodulatoare antiinflamatoare și efecte de vindecare a plăgilor. Datorită solubilității în grăsimi, greutatea moleculară scăzută și dimensiunilor mici, UE sunt capabile să treacă prin piele, mucoase și membrane celulare și astfel să intre în circulația sistemică a corpului. Multe infecții cu enterovirus sunt asimptomatice. Virusurile Coxsackie A și B pot declanșa diferite manifestări clinice, infecții respiratorii, meningita, miocardita.

În cadrul Fazei 1 a proiectului a fost utilizată linia RD pentru titrare virusului Coxsackie B și a fost evaluat efectul citotoxic al Uleiurilor esențiale asupra liniei celulare.

A fost stabilit protocolul de lucru care are următoarele etape:

1. Evaluarea activității substanței antivirale de a preveni atașarea virusului la celula gazdă;
2. Evaluarea activității virucide sau neutralizante a substanței antivirale - pretratarea virionilor cu substanțe antivirale;
3. Tratatamentul concomitent al celulelor și virionilor în timpul inoculării cu virus/infecției celulare
4. Tratatament post-intrare: examinarea interferenței substanței de testare antivirală cu ciclul de replicare intracelulară a virusului;
5. Test de intrare/fuziune virală;
6. Calcularea Indicelui de selectivitate (IS) - raportul dintre citotoxicitate (CC50) și activitatea antivirală (IC50) a unui compus de testat antiviral. O valoare a IS de 4 sau mai mult este adecvată pentru un agent antiviral.

3. Supravegherea culicidelor și a arbovirusurilor transmise de acestea la nivelul capitalei a început la 21 iunie 2023 și s-a încheiat la 20 septembrie 2023. Pentru colectarea culicidelor s-au utilizat capcane de tip CDC – Gravid Trap, care au operat continuu, schimbarea bateriilor făcându-se săptămânal. Capcanele au fost amplasate în 12 locații din București, șase dintre acestea fiind în responsabilitatea Companiei Municipale Eco-Igienizare București (operatorul municipal responsabil cu activitatea de dezinsecție). Celelalte șase situri, situate în sectoarele 5 și 6 ale capitalei, au fost în grija INCDMM „Cantacuzino”. Colectarea țânțarilor s-a făcut periodic la 2-4 zile. După colectare, țânțarii au fost aduși în laborator și identificați morfologic la nivel de specie, utilizând cheile dihotomice descrise de Becker (2010). Adicional, în luna august, a fost investigat și un sit din municipiul Giurgiu. După identificare, femelele aparținând speciei *Culex pipiens* și o mai mică proporție din specia invazivă *Aedes albopictus* au fost sortate în probe (loturi) de 20-45 exemplare pentru detecția prezenței virusului West Nile (WNV). Constituirea loturilor s-a făcut în acord cu situl investigat și perioada de colectare. Inițial, loturile au fost testate prin tehnica imunocromatografică RAMP – Rapid Analyte Measurement Platform (Response Biomedical Corporation), această metodă prezentând avantajul ușurinței de utilizare și facilitează obținerea unui rezultat rapid. În cele șase situri investigate de INCDMM „Cantacuzino”, a fost colectat pe perioada supravegherii un număr de 6181 de culicide aparținând la patru specii: *Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Culex pipiens* s.l. și *Culiseta longiareolata*. S-au constituit 128 de loturi de analiză, însumând 4224 femele de țânțari. Loturile identificate ca pozitive pentru WNV prin testul RAMP (21), au fost constituite din insecte colectate în București. Din țânțarii colectați în orașul Giurgiu a fost constituită o singură probă, dar care a fost negativă pentru WNV.

Cele 21 loturi de țânțari pozitive pentru WNV la testul RAMP, au fost analizate prin real-time PCR pentru confirmarea prezenței virusului. Din cele 21 probe testate, zece au fost confirmate prin real-time PCR ca fiind pozitive pentru WNV. Pentru analiza filogenetică a virusurilor detectate în probele de țânțari în prezentul studiu, a fost obținut prin tehnica revers transcriere end-point semi-nested PCR un fragment ADN (748 nt) din regiunea NS5 a genomului viral (Dinu S, 2015). Ampliconii au fost secvențiați prin tehnica Sanger (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems; SeqStudio Genetic Analyzer, ThermoFisher Scientific), iar secvențele obținute au fost inspectate vizual și editate cu BioEdit 7.2.5 (Hall TA, 1999), analizate prin interogarea bazelor de secvențe (NCBI BLAST, [www.genomedetective.com](http://www.genomedetective.com)) și folosite pentru deducerea relațiilor filogenetice cu programul Mega X (Kumar S, 2018). Au fost obținute secvențe parțiale WNV pentru opt probe (valori Ct cuprinse între 14,10 și 30,43). Analiza a arătat apartenența virusurilor studiate la linia genetică 2, clada central-sud europeană. Analiza BLAST a secvențelor parțiale WNV obținute în studiul de față indică identitate nucleotidică de până la 99,85% cu secvențe din perioada 2015-2016, obținute din probe umane sau de țânțari colectate în

București sau Delta Dunării, dar și cu secvențe mai recente din Grecia (2019-2022). Identitate nucleotidică de până la 99,70% se constată cu secvențe din România și Bulgaria (2018). Aceste observații susțin endemizarea tulpinii în România, dar și în țările din această regiune a Europei. După obținerea acestor rezultate, au fost înștiințate autoritățile naționale (Institutul Național de Sănătate Publică) și locale (Primăria Municipiului București) asupra siturilor de circulație a WNV și a tulpinii identificate, pentru implementarea rapidă a acțiunilor de control vectorial. Notificarea a fost realizată înainte de debutul primelor cazuri de infecție la om în București.

4. Metodele fenotipice de identificare corelate cu metodele moleculare completează diagnosticul microbiologic al patogenilor enterici implicați în Boală Diareică Acută (BDA) care reprezintă o provocare pentru sănătatea publică. Fiecare metodă prezintă limite, corelarea celor 2 metode de identificare (metoda fenotipică clasică și metoda moleculară) completează diagnosticul microbiologic corect.

Identificarea speciilor *Aeromonas* a fost realizată utilizând teste biochimice clasice (teste biochimice multitest și bateria extinsă de teste biochimice (zaharuri, aminoacizi), galerii API 20 E, teste automate Vitek 2C, Maldi Toff, dar care nu au fost întotdeauna concludente. Confirmarea de certitudine a principalelor specii de *Aeromonas* s-a realizat utilizând o metodă moleculară - multiplex PCR (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. media*). S-au optimizat 2 reacții multiplex PCR pentru diferențierea speciilor pentru tulpini din genul *Aeromonas* și *Vibrio*. Pentru bacterii din genul *Aeromonas* s-au utilizat genele *gyrB* și *rpoB* pentru identificarea a patru specii de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. media*, *A. veronii* și *A. caviae*). S-a optimizat o reacție de multiplex PCR care poate detecta simultan 4 specii majore *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* și *V. cholerae*), utilizând 4 gene: gena *gyrB* pentru *V. alginolyticus*, gena *col* pentru *V. parahaemolyticus*, gena *vhA* pentru *V. vulnificus* și gena *ompW* pentru *V. cholerae* și o pereche de primeri IAC care a fost proiectată în regiunile conservate ale genei ARNr 16S bacteriene și care este utilizată pentru a indica rezultate fals negative.

5. Identificarea unor biomarkeri biochimici, imunologici, hematologici și bacteriologici cu rol predictiv pentru evoluția pacienților cu infecții urinare recurente care urmează tratament personalizat cu vaccinuri autogene”

Scopul studiului este identificarea unor biomarkeri de natură **biochimică, imunologică, hematologică din serul pacientului** și a unor caracteristici fenotipice și genotipice ale tulpinilor bacteriene izolate de la pacienți cu infecții recurente de tract urinar, din urină și materii fecale (**markeri bacteriologici**), **cu rol predictiv pentru evoluția acestora**, înainte, în timpul și după încheierea tratamentului personalizat cu vaccinuri autogene (autovaccinuri).

Dintre obiectivele studiului au fost realizate următoarele:

1. Stabilirea markerilor biochimici, imunologici, hematologici și bacteriologici care vor fi determinați și monitorizați/
2. Stabilirea condițiilor de includere/excludere a pacienților în studiu;
3. Selecția și recrutarea pacienților, includerea într-unul din brațele studiului;
4. Determinarea valorilor inițiale ale biomarkerilor (înainte de inițierea tratamentului cu autovaccin) (setul 1 și 2);
5. Determinarea valorilor biomarkerilor la încheierea tratamentului cu autovaccin (setul 3 și 4).

În cadrul **fazei 1b /2023** - "Algoritm de detecție a microorganismelor cu profil de multirezistență", au fost dezvoltate și validate metodele de testare și analiză a datelor în raport cu performanțele așteptate și cu potențialul de utilizare reală ale acestora pentru caracterizarea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice.

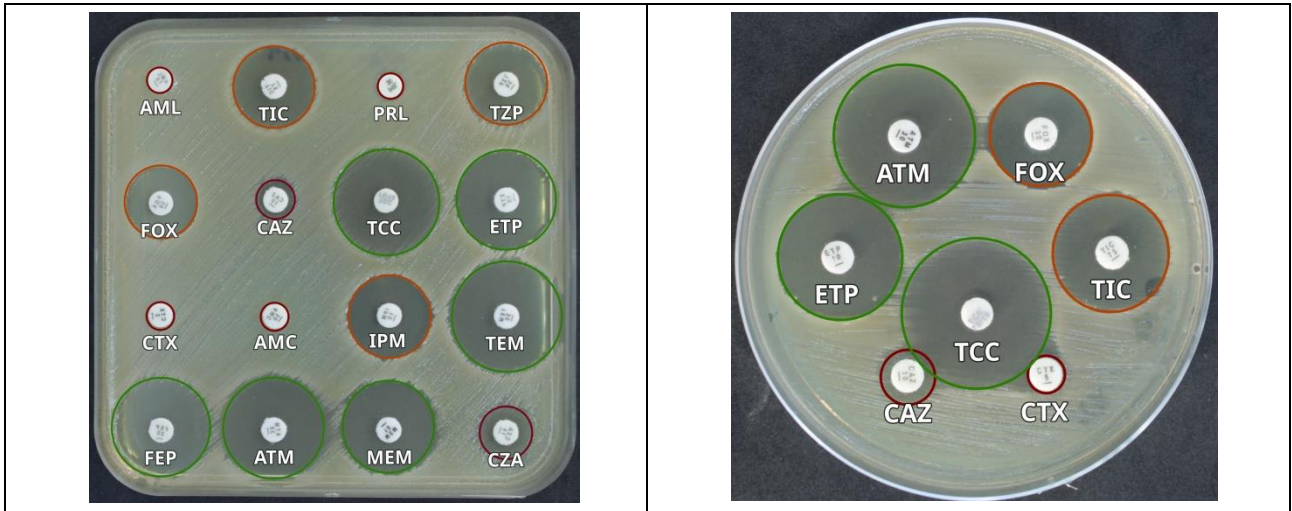
**Metoda** de testare a fost reprezentată de evaluarea metodelor fenotipice reprezentate de lectura interpretativă a antibiogrammei difuzimetrice, confirmarea prin antibiogramă prin metoda microdiluțiilor, folosirea de metode specifice de diagnostic diferențial al producției de carbapenemaze (medii cu inhibitori produse local – Mueller Hinton Oxacilină, teste de confirmare a producției de carbapenemaze dezvoltate local - rCIM-IMP) și teste comerciale de identificare a mecanismelor de rezistență (teste imunocromatografice NG Carba 5, NG mcr-1, Coris OKNVM).

#### **Premise**

În 2018, EUCAST face recomandări de *screening* a producției de carbapenemaze, sugerând limite de detecție pentru Meropenem și/sau Ertapenem.

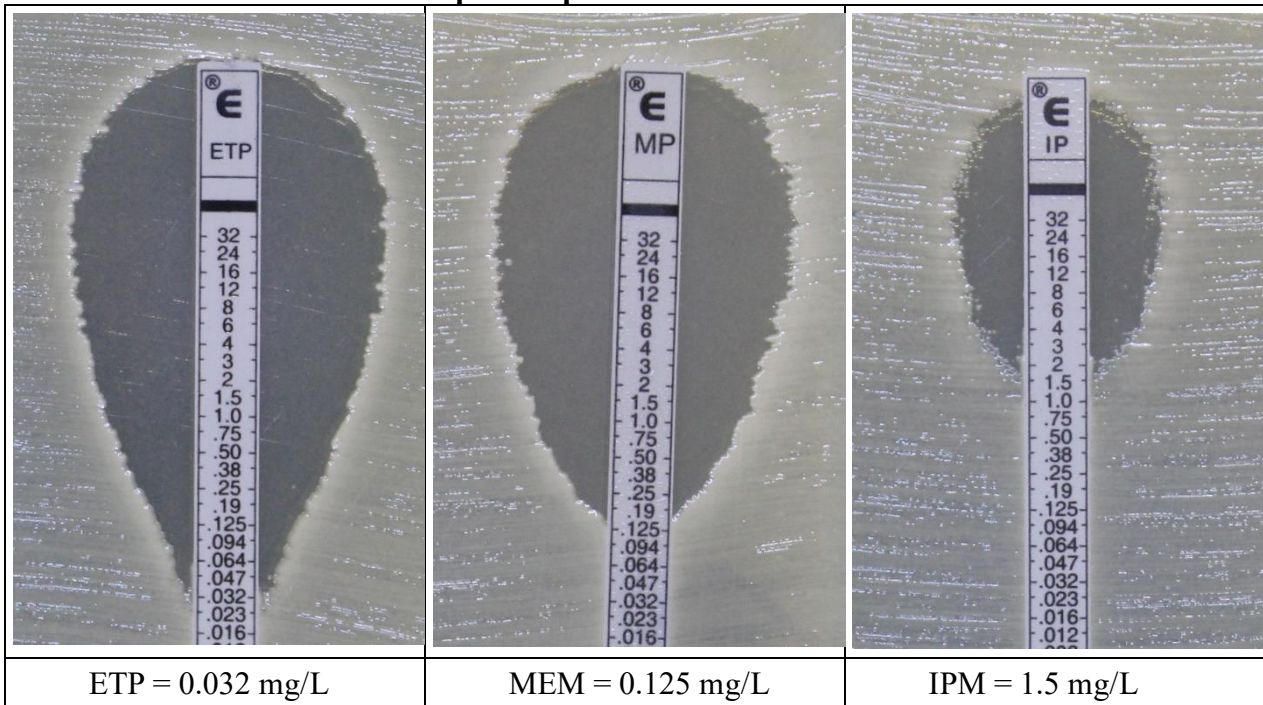


Cu toate acestea, 10% din microorganismele producătoare de carbapenemaze sunt susceptibile la carbapenemi și în afara limitelor de *screening* pentru carbapenemaze. Astfel încât laboratorul INRA și-a propus reevaluarea criteriilor de evaluare și fluxul de evaluare a microorganismelor cu profil de multirezistență.

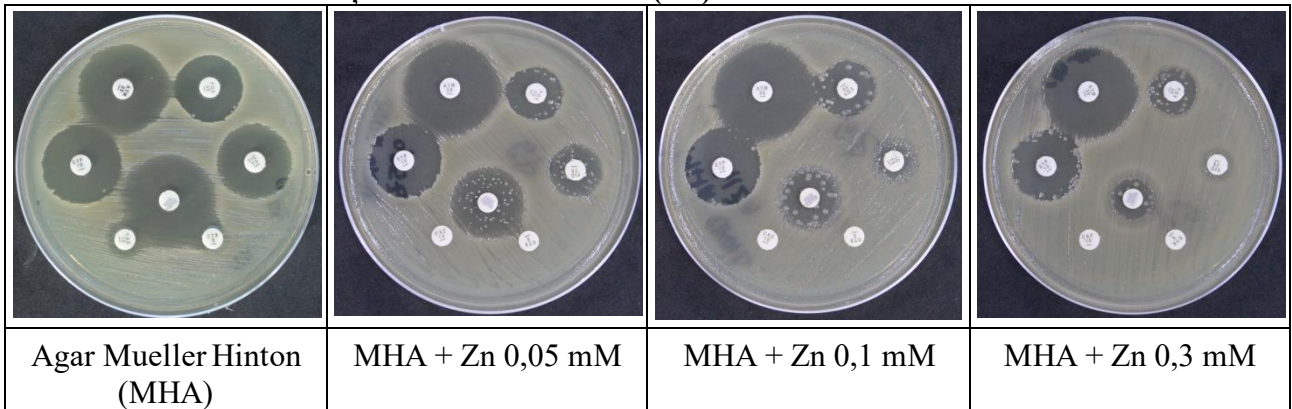


Profilul de susceptibilitate este particular, prezentând susceptibilitate la carbapenemi (ETP, MEM) și rezistență la ceftazidim-avibactam (CZA). Ca notă, diametrul la Imipenem nu poate fi folosit în acest caz, fiind vorba despre o *Morganellaceae*, cu nivel de susceptibilitate scăzut.

#### Determinarea CMI la carbapenemi prin tehnica E-test



#### Determinarea influenței c% ionilor de Zinc (Zn)



Adăugarea de Zn în mediu de testare standard (MHA) a condus la diminuarea zonelor de inhibiție în jurul discurilor de antibiogramă, cu excepția Aztreonamului, antibiotic asupra cărora NDM nu are activitate litică.

### Influența factorilor de testarea în laborator

Mediul de pe care s-a efectuat testarea	Inoculul folosit pentru testarea	Creștere din fluide biologice

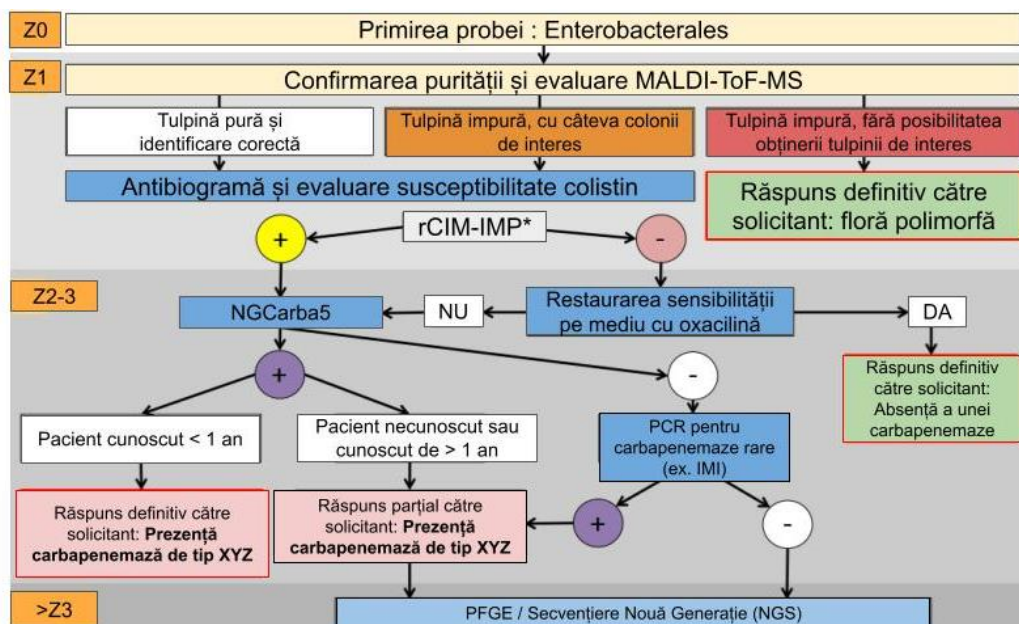
Testarea de pe mediul Mueller-Hinton, din jurul discului de Cefotaxim-Avibactam (CZA) – nu s-a obiectivat linie de detecție NDM. Testarea de pe mediu cromogen comercial (Uriselect 4) și mediu *in-house* TSA cu supliment Zn (0.3 mM) - se obiectivează linie de detecție NDM.

Testarea de inocule diferite: ansă 1μL – 1 colonie, ansă de 1μL – multiple colonii – nu se obiectivează linie de detecție NDM. Ansă de 10μL, necesitând adăugare suplimentare de tampon de migrare a testului imunocromatografic - se obiectivează linie de detecție NDM.

Testarea bacteriei crescute, centrifugată din ser și urină - se obiectivează linie de detecție NDM doar atunci când tulpina este crescută în ser, sugerând implicarea patogenică în cursul bacteremiei.

### Discuții

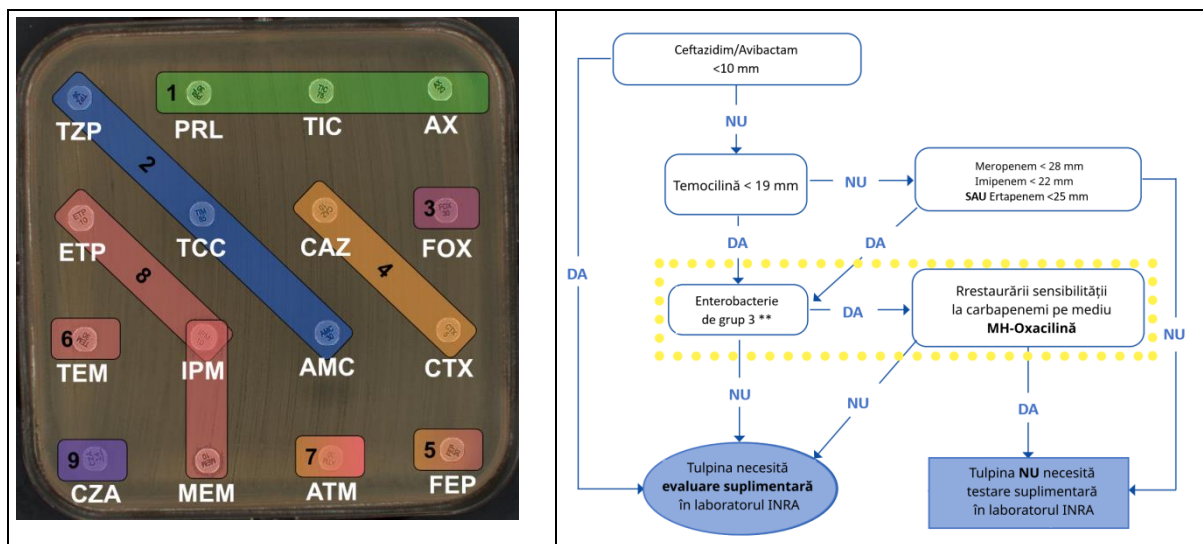
Astfel, s-a implementat fluxul de evaluare a tulpinilor de Enterobacterales în laboratorul INRA.





## Lectura interpretativă a antibiogramei va folosi următoarele clase de antibiotice:

1. Peniciline (Amoxicilină, Piperacilină, Ticarcilină)
    1. Peniciline + inhibitori de beta-lactamaze (Amoxicilină-Clavulanat, Piperacilină-Tazobactam, Ticarcilină-Clavulanat)
    2. Cefamicină (Cefoxitină) - Marker AmpC
    3. Cefalosporine de generația a 3-a (Cefotaxim, Ceftazidim) - marker ESBL
    4. Cefalosporine de generația a 4-a (Cefepim) - marker AmpC, ESBL
    5. Temocilină - Marker OXA-48
    6. Monobactam (Aztreonam) - Marker MBL, ESBL
    7. Carbapenemi (Ertapenem, Meropenem, Imipenem) - Marker Carbapenemaze
    8. Cefalosporină de generația a 3-a + inhibitori de beta-lactamaze de nouă generație (Ceftazidim-Avibactam) - Marker Carbapenemaze, AmpC, ESBL, MBL
- Fluxul de interpretare al antibiogramei difuzimetrice a fost sumarizat în figura de mai jos.



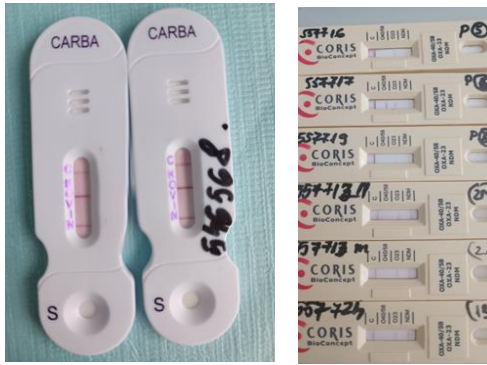
Testele NG Carba 5 (NG Biotech) și Resist Acineto (Coris BioConcept) sunt două teste imunocromatografice rapide *in vitro* care sunt utilizate pe scară largă pentru detectarea celor mai frecvente carbapenemaze la *Enterobacterales*, *Pseudomonas spp.* și *Acinetobacter spp.*

Testele Resist Acineto detectează rapid (una sau mai multe) carbapenemaze de tip OXA-23, OXA-40/58 și NDM la *Acinetobacter baumannii* complex, iar testele NG Carba 5 permit detecția uneia sau mai multor enzime de tipul carbapenemazelor, cele mai frecvent întâlnite în *Enterobacterales* și *Pseudomonas spp.*: KPC (K), OXA-48-like (O), IMP (I), VIM (V), NDM (N).

A fost realizat un screening al tulpinilor rezistente la carbapeneme și în acelasi timp cu fenotip XDR (extended drug resistance) sau PDR (pan-drug resistance) de *Klebsiella pneumoniae* și *Acinetobacter baumannii* primite în cadrul laboratorului INRA, selectarea lor și alcatuirea unei colecții de tulpini producătoare de carbapenemaze în vederea optimizării și implementării reacțiilor multiplex real time PCR (sistem deschis).

Cele mai multe din tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* analizate prezintă simultan două carbapenemaze NDM și OXA-48, tulpinile fiind rezistente și la colistin.





Tulpinile de *Acinetobacter* analizate produc două carbapenemaze OXA-23 și NDM sau combinația de carbapenemaze OXA-23 și OXA-40/58 sau doar carbapenemaze de tip OXA-23.

#### **Rezultate publicate/diseminate**

- 1 lucrare științifică publicată în jurnalul cu factor de impact ISI ne-nul Eurosurveillance;
- 4 comunicări științifice naționale.