

**ROMÂNIA**  
**MINISTERUL APĂRĂRII NAȚIONALE**



**Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare  
Medico-Militară „Cantacuzino”**

**SINTEZA RAPORTULUI FINAL DE ACTIVITATE  
privind desfășurarea programului-nucleu**

Dezvoltarea potențialului de evaluare a riscului biologic și de răspuns rapid în epidemii și pandemii și dezvoltarea de metode și produse terapeutice și preventive pentru îmbunătățirea stării de sănătate a populației, BIOEPITERAPII, cod 19 14

**Durata programului: 4 ani**

**Data începerii: 13.03.2019**

**Data finalizării: 09.12.2022**

**1. Scopul programului:**

Scopul programului este realizarea de studii și cercetări destinate îmbunătățirii și dezvoltării metodologiei de evaluare a riscului biologic (epidemii, pandemii) și de combatere a acestuia printr-un răspuns rapid și eficient, în vederea asigurării protecției intereselor esențiale ale siguranței stării de sănătate a populației.

Programul continuă și dezvoltă ariile de competență tradițională ale Institutului „Cantacuzino” inițiate în programele anterioare, aducând în plus, focalizarea pe acele domenii esențiale atât pentru asigurarea stării de sănătate a populației, cât și contribuții în situații de criză, de epidemii și pandemii, ce pot afecta atât sistemul național de sănătate publică, cât și securitatea națională a României. De asemenea, urmărește implementarea celor mai moderne și eficiente tehnologii dezvoltate pe plan mondial în domeniile de interes pentru a permite dezvoltarea unui arsenal metodologic capabil să asigure prevenirea și combaterea eficientă și imediată a oricăror situații neprevăzute cu efect asupra sănătății populației.

**2. Descrierea proiectelor și a rezultatelor :**

**2.1. PN 19 14 01 01 - Cultivarea virusului rabic fix pe culturi celulare în vederea dezvoltării de vaccinuri bazate pe biotehnologii celulare de ultimă generație**

În prezent, țările din Uniunea Europeană și America de Nord utilizează pentru profilaxia turbării la om, vaccin rabic inactivat, obținut după multiplicarea virusului rabic fix în culturi de celule animale sau umane.

În România, s-a utilizat tulpina de virus rabic fix izolată de profesorul Babeș în anul 1887, vaccinul fiind preparat printr-o tehnologie învechită și neacceptată la nivel EU/EEC, din țesut nervos prelevat de la șoareci sugari de laborator - inoculați în acest scop. Astfel că, în cadrul proiectului, au fost efectuate următoarele activități, menționate în continuare.

În prima fază, au fost selectate, multiplicare și crioconservate în azot lichid, liniile celulare stabilizate permissive pentru virusul rabic, anume C1300-NA, BHK-21 și Vero, precum și linia celulară RK13. Pornind de la țesut cerebral de iepure utilizat pentru menținerea curentă a tulpinii în I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, tulpina Babeș de virus rabic fix a fost inoculată în două dintre liniile celulare (C1300-NA și BHK-21) pentru izolare primară. De asemenea, a fost realizat un profil al produsului țintă (*TPP -target product profile*) care include toate caracteristicile și atributele minime

necesare pentru etapele de dezvoltare ulterioară ale unui vaccin antirabic de uz uman, pe baza cerințelor și recomandărilor O.M.S. (WHO,2007; WHO, 2018)

În faza a doua, tulpina Babeș de virus rabic fix a fost izolată în culturi celulare și multiplicată *in vitro*, pe patru linii celulare, cu rezultate variabile, după examinarea celulelor inoculate prin testul de imunofluorescență directă cu anticorpi policlonali anti-virus rabic cuplați cu fluoresceină (produs comercial de la Bio-Rad).

Ulterior, în faza a treia, tulpina virală Babeș adaptată pe culturi celulare și denumită BAB-TMP, s-a multiplicat în bioreactoare de unică folosință, s-a comasat, s-a inactivat cu  $\beta$ -propiolactonă și a fost concentrată de 20-40 de ori prin metoda precipitării cu polietilenglicol (PEG 6000) și sulfat de amoniu. Precipitatele concentrate au fost rediluate și s-au utilizat ca antigene pentru a se detecta glicoproteina G prin ELISA, varianta indirectă, utilizând trei anticorpi monoclonali comerciali specifici (Bio Rad). De asemenea, au fost efectuate lucrări de amplificare genică prin RT-PCR, urmate de secvențierea parțială a genomului viral.

În faza 4, anul 2022, s-au preparat trei tipuri de antigene vaccinale inactivate din tulpina BAB-TMP cultivată pe linia celulară BHK-21, folosind drept inactivanți  $\beta$ -propiolactona (BPL) și peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ), precum și concentrarea prin precipitare cu sulfat de amoniu sau după filtrare tangențială (TFF). Evaluarea potenței antigenelor s-a efectuat prin testul NIH pe șoarece (modificat), raportat la standardul internațional de vaccin rabic NIBSC 16/204 (2018), urmată de cuantificarea anticorpilor anti-glicoproteina G virală prin ELISA cu trusă comercială de diagnostic veterinar (Platelia<sup>TM</sup> Rabies II Kit, Bio-Rad).

Profilul produsului țintă (TPP -target product profile) realizat, include toate caracteristicile și atributele minimale necesare pentru un vaccin antirabic de uz uman, pe baza cerințelor și recomandărilor O.M.S. (WHO,2007; WHO, 2018) a Agenției Naționale a Medicamentului și Dispozitivelor Medicale din România, bibliografiei contemporane de specialitate și capabilităților existente în cadrul I.N.C.D.M.M., „Cantacuzino”. Rezultatele au arătat că tulpina BAB-TMP de virus rabic fix se multiplică consistent *in vitro* prin pasaje repetate în bioreactor de unică folosință, cu suprafețe suprapuse, producând cel puțin 106 TCID<sub>50</sub>/ml în linia celulară BHK-21 după 15 pasaje virale, premisă esențială pentru continuarea cercetărilor în scopul dezvoltării ulterioare a unor noi produse biotehnologice utilizate pentru profilaxia și combaterea rabiei. Titrurile sunt comparabile cu cele produse anterior după multiplicarea virusului prin pasaje intracerebrale pe iepure. Glicoproteina G virală, principalul component inductor de imunitate protectivă în organismele vaccinate, a fost detectată prin ELISA cu anticorpi monoclonali specifici, în probe preparate din linia celulară BHK-21 inoculată cu virus. De asemenea, gena codificatoare a glicoproteinei G din tulpina Babeș a fost amplificată prin RT-PCR și secvențiată parțial. Analiza BLASTn a genei G a arătat că există similitudine genomică de 93,5-94,29% între tulpina Babeș de virus rabic fix și tulpini de virus rabic la nivel global, între care similitudine de aproximativ 94% cu tulpini vaccinale având origine în China și Rusia. Pe de altă parte, dacă ne raportăm la tulpinile clasice de virus rabic vaccinale utilizate la nivel mondial, analiza BLASTn a genei G parțiale a arătat un grad de similitudine de 91.81% între tulpina Babeș de virus rabic fix și tulpina Pasteur, atunci când au fost supuse analizei secvențele nucleotidice, iar analiza aminoacizilor traduși de gena G a arătat cel mai ridicat grad de similitudine, de 96,23%, cu tulpina vaccinală Pitman-Moore.

Testul NIH a relevat o potență relativă (RP) de 0,4 IU/ml pentru antigenul BPL, de 0,08 IU/ml pentru antigenul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și de 2 IU/ml pentru antigenul TFF. Serul animalelor care au rezistat infecției de control au avut concentrații ridicate de anticorpi specifici glicoproteinei G, mai mari de 4 EU/ml, cele mai multe având peste 200 UE/ml, după 28 zile de la rapel.

În concluzie, au fost dezvoltate metode și protocoale de lucru pentru cultivarea virusului rabic fix pe culturi celulare, ca bază de plecare pentru elaborarea unui tip de vaccin rabic de generație recentă, precum și metode de testare a antigenelor virale în privința capacității imunizante a acestora și a fost elaborată o tehnologie scalabilă de cultivare a virusului și de producere a unor antigene inactivate pentru avansarea dezvoltării vaccinului rabic de uz uman către validare CMC (chemistry, manufacturing, control) și studii pilot.

Astfel, obiectivele proiectului au fost atinse 100% în privința lucrărilor efectuate și sunt în curs lucrări de elaborare a unei cereri de brevet și a unor publicații științifice în reviste internaționale.

## **2.2. PN19140102 - Organizarea biobăncii de linii celulare și probe biologice umane ca structură de tip *core facility* pentru Institutul National de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”**

În vederea dezvoltării biobăncii de linii celulare și probe biologice umane ca structură de tip *core facility* în cadrul I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, au fost desfășurate următoarele activități:

- au fost elaborate noi protocoale de lucru pentru linii celulare;
- a fost efectuat un stagiu de cercetare în domeniul biobanking;
- a fost completată colecția de linii celulare cu zece linii umane și murine certificate;
- prezentări științifice pe problematica utilității biobăncilor în general și a biobăncii I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” în special, cerințele privind organizarea și desfășurarea activității în cadrul biobăncii, oportunitățile de colaborare în cadrul proiectelor de cercetare și armonizarea în cadrul rețelelor de biobănci.

În ceea ce privește documentația operațională, în cadrul proiectului a fost completat portofoliul de documente operaționale cu instrucțiuni de lucru vizând testarea sterilității (suprafețe, tegumente etc), a fost optimizat protocolul de lucru pentru evaluarea citotoxicității *in vitro* prin metoda cu MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) și a fost elaborat documentul corespunzător.

În plus, s-a realizat documentarea în vederea stabilirii și standardizării unor metode de conservare a materialului reproductiv animal ce urmează a fi stocat în cadrul Biobăncii I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”. Probele biologice vor proveni în primul rând din cadrul animaleriei Institutului, unitate producătoare de animale de laborator SPF (Specific Pathogen Free).

În contextul pandemiei SARS CoV-2, nu a fost posibilă organizarea unei sesiuni de instruire (aspecte teoretice și practice) cu un număr mare de participanți. În schimb, timp de 6 luni, au fost instruite în tehnici de biobanking, trei specialiști, nou angajați în Biobanca I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”.

În anul 2022 au fost continuate demersurile pentru organizarea unei biobănci care să răspundă cerințelor instituționale de gestionare a probelor biologice (linii celulare și probe umane) și necesităților de instruire în lucrul cu linii celulare, probe biologice animale și umane, etica experimentelor ce utilizează probe animale și umane. Au fost stabilite și elaborate protocoale și instrucțiuni de lucru, materiale elaborate privind lucrul cu linii celulare standardizate (viitor manual de tehnici de biobanking) și a fost organizat un simpozion cu titlul „Bioetica în experimentarea pe animale”. Toate acestea au vizat atât orientarea activităților către un sistem de bune practici de laborator, cât și gestionarea probelor și a datelor, în acord cu prevederile naționale și internaționale privind lucrul cu probe umane (ex: convenția de la Oviedo privind drepturile omului și Biomedicina) sau probe animale (ex: protocolul de la Nagoya privind accesul la resursele genetice).

Rezultatele studiilor teoretice și practice au dus la stabilirea și elaborarea de instrucțiuni și protocoale de lucru, scrierea unui material complex privind tehnicile de lucru cu linii celulare (viitor manual de tehnici de biobanking – vol I) și organizarea de instruirii privind lucrul cu linii celulare și etica experimentelor ce utilizează în proceduri animale și/sau probe biologice umane, adresate atât specialiștilor din I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, cât și celor din afara Institutului.

## **2.3. PN19140103 - Modularea răspunsului imun de către factori endogeni/exogeni care activează receptorii imunității înnăscute**

Studiile efectuate în cadrul acestui proiect au urmărit potențialul de maturare a celulelor dendritice imature (CDI) în celule dendritice mature de către sisteme antigenice, cum ar fi lizate polibacteriene și antigene tumorale cu potențial imunogen. Aceste sisteme antigenice au fost obținute și testate *in vitro* pe precursori mioeloidi murini ca sursă de CDI caracterizate morfologic și fenotipic.

Rezultatele obținute au arătat că lizatele polibacteriene induc maturarea CD și producerea de citokine cu rol important în reglarea/polarizarea răspunsului imun.

Stimularea CDI cu lizate provenind de la celule tumorale B16F10 induce maturarea incompletă a CD, tratamentul cu mitoxantronă (MTO) are efect cumulativ cu maturarea indusă de LPS, ceea ce sugerează potențialul imunogen al acestor sisteme antigenice de origine tumorală.

Pulsarea concomitentă a CDI derivate din măduva osoasă cu lizate polibacteriene și lizate provenind de la celule tumorale B16F10 tratate cu MTO determină creșterea secreției de TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40 și IL-12p70 comparativ cu lizatele de la celulele B16F10 netratate, nivelul secreției acestor citokine fiind comparabil cu cel indus de stimularea cu LPS.

Cocultivarea CD maturate cu lizate bacteriene și stimulate cu peptidul antigenic HA cu limfocite T izolate de la șoareci transgenici TCR-HA+/-, care prezintă clona de limfocite cu receptor TCR pentru hemaglutinina virusului gripal A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) a determinat creșterea semnificativă a concentrației de IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17A, IL-13 și IL-6 după stimularea antigen-specifică. Comparativ cu LPS, toate lizatele bacteriene analizate au indus nivele mai crescute de IL-6 și nivele similare pentru restul citokinelor studiate, evidențiind aceeași capacitate de stimulare la nivelul receptorilor TLR.

În prima etapă au fost obținute sisteme antigenice bacteriene și tumorale. Rezultatele obținute au evidențiat că celulele SW-403 au un potențial imunogen mult mai crescut comparativ cu celulele HT-29, iar în cazul antigenelor bacteriene și a diferitelor formulări propuse au fost identificate calități imunomodulatoare.

În etapa 2, prin studiile efectuate *in vitro*, s-a observat că amestecurile bacteriene utilizate activează secreția de citokine de către macrofagele umane, în principal, ca urmare a activării receptorilor TLR4, și nu este influențată de modalitatea de liză a bacteriilor. În continuare, în etapa 3 s-a realizat protocolul de diferențiere a precursorilor mieloizi în celule dendritice imature (CDi) demonstrat prin analiza morfologică și fenotipică. În etapa 4 s-a demonstrat că amestecurile bacteriene utilizate cresc procentul de celule dendritice (DC) care exprimă molecule MHC clasa a II-a și CD86, precum și producerea de către acestea de citokine cu rol important în reglarea/polarizarea răspunsului imun. Etapa 5 a urmărit, pornind de la rezultatele din etapele anterioare, selectarea protocolului de obținere a sistemului antigenic tumoral. Rezultatele obținute arată că, preincubarea DC derivate din măduva osoasă cu lizate provenind de la celule tumorale B16F10 tratate cu MTO are efect cumulativ cu maturarea indusă de LPS, ceea ce sugerează potențialul imunogen al acestor sisteme antigenice de origine tumorală.

Pentru etapele următoare, s-au evidențiat:

- etapa 6: rezultatele obținute au arătat ca pulsarea concomitentă a DC derivate din măduva osoasă cu amestecuri bacteriene și lizate provenind de la celule tumorale B16F10 tratate cu MTO determină creșterea secreției de TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40 și IL-12p70 comparativ cu lizatele de la celulele B16F10 netratate, nivelul secreției acestor citokine fiind comparabil cu cel indus de stimularea cu LPS;
- etapa 7: celulele maturate cu două dintre cele trei lizate bacteriene studiate au secretat o cantitate semnificativ mai mare de IFN- $\gamma$  comparativ cu celulele nestimulate, chiar și comparativ cu maturarea indusă de LPS iar pulsarea cu HA nu a influențat semnificativ secreția de citokine cu excepția maturării cu LPS care a indus amplificarea secreției de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  și TNF- $\alpha$ ;
- etapa 8 - DC diferențiate pornind de la celule medulare de la șoareci Balb/c au fost maturate cu LPS sau lizate bacteriene, stimulate sau nu antigen-specific cu peptidul antigenic HA și cocultivate cu limfocite T izolate de la șoareci transgenici TCR-HA+/-, care prezintă clona de limfocite cu receptor TCR pentru hemaglutinina virusului gripal A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) adaptat în model murin. Rezultatele au evidențiat pentru toate condițiile de maturare a DC o creștere semnificativă a concentrației de IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17A, IL-13 și IL-6 după stimularea antigen-specifică. Comparativ cu LPS, toate lizatele bacteriene analizate au indus nivele mai crescute de IL-6 și nivele similare pentru restul citokinelor studiate, evidențiind aceeași capacitate de stimulare la nivelul receptorilor TLR.

Comparativ cu lizatele bacteriene, rezultatele obținute în etapele anterioare arată că, preincubarea DC imature cu lizate provenind de la celule tumorale B16F10 tratate cu MTO, induce maturarea incompletă a DC, dar are efect cumulativ cu maturarea indusă de LPS .

## **2.4. PN19140104 - Dezvoltarea unor metode pentru caracterizarea complexă a răspunsului imun la nivel tisular**

Dezvoltarea metodelor pentru caracterizarea complexă a răspunsului imun la nivel tisular a presupus următoarele faze.

Faza 1: evaluarea substanțelor folosite ca matrice în spectrometria de masă MALDI din punct de vedere fizico-chimic, în scopul dezvoltării unui ansamblu de metode bazate pe imagistică prin spectrometrie de masă, care să permită caracterizarea complexă a răspunsului imun la nivel tisular și a modificării acestuia în urma vaccinării sau a tratamentului antiinflamator / imunomodulator. Activitățile, desfășurate în acest sens au constat în studiul la nivel microscopic a cristalelor de matrice prin microscopie de fluorescență, studiul prin imagistică MALDI a cristalelor de matrice și evaluarea interacției dintre matrice și analiți.

Faza 2: evaluarea influenței acidului trifluoroacetic asupra capacităților de matrice de spectrometrie de masă a acidului 2,5-dihidroxibenzoic și evaluarea prin imagistică MALDI a posibilității de detecție concomitentă a doi compuși hidrofobi diferiți cu ajutorul acidului 2,5 – dihidroxibenzoic

Faza 3: separarea unor compuși cu potențial imunomodulator prin cromatografie în strat subțire (TLC) și detecția prin MALDI-MS a compușilor separați prin TLC

Faza 4: identificarea compușilor separați prin cromatografie în strat subțire prin intermediul imagisticii prin spectrometrie de masă MALDI

Faza 5 : identificare de modificări fenotipice la nivel de proteom pe celule cultivate in vitro și selecția de biomarkeri pentru descrierea modificării răspunsului imun in vitro în urma tratamentului cu imunomodulatori

Faza 6: identificare de modificări fenotipice la nivel de proteom pe țesut și selecția de biomarkeri pentru descrierea modificării răspunsului imun în țesut, în urma tratamentului cu imunomodulatori.

În cadrul proiectului, obiectivele fazelor au fost îndeplinite în totalitate: au fost analizați din punct de vedere fizico-chimic compuși folosiți ca matrice în spectrometria de masă MALDI. Pentru acidul 2,5 – dihidroxibenzoic s-a putut pune în evidență, prin microscopie de fluorescență, existența polimorfismului de cristalizare și a putut fi corelat cu spectre de masă complet distincte. De asemenea, s-a observat, pentru toate matricele din studiu, partiția discretă a semnalului de analit. S-a evaluat influența acidului trifluoroacetic asupra capacităților de matrice de spectrometrie de masă a acidului 2,5-dihidroxibenzoic și, de asemenea, s-a reușit detecția și analiza a doi compuși hidrofobi diferiți cu ajutorul acidului 2,5 – dihidroxibenzoic prin imagistică MALDI.

S-a reușit separarea prin cromatografie în strat subțire a unui amestec de fosfolipide și cuplarea cu imagistică MALDI, precum și identificarea compușilor separați prin cromatografie în strat subțire prin cuplarea cu imagistică MALDI.

## **2.5. PN19140105 - Metode de imagistică pentru evaluarea captării, traficului intracelular, procesării și prezentării antigenelor de către celulele dendritice în contextul utilizării diverșilor adjuvanți**

În scopul dezvoltării metodelor care să evidențieze traficul intracelular, procesarea și prezentarea antigenelor, proiectul a presupus activități preliminare și de evaluare a conceptelor, grupate în câteva faze.

Faza 1: activitățile derulate au vizat designul și clonarea unor proteine de fuziune activabile prin proteoliza cu situs de clivare pentru tripsina, prin următoarele etape:

- design-ul unei proteine de fuziune cu proprietăți de fluorescență modificabile prin proteoliză;
- optimizarea codonilor genei proteinei de fuziune pentru a permite un nivel mare de expresie în E. coli;
- design-ul oligonucleotidelor necesare pentru sinteza genei codon optimizate.

Faza 2: activitățile derulate au vizat expresia și purificarea unei proteine de fuziune de fluorescență bazată pe EGFP, modificarea chimică a proteinei de fluorescență pentru obținerea unei sonde FRET și demonstrarea modificării proprietăților fluorescente ale sondei FRET prin proteoliză.

Faza 3: două proteine de fluorescență, GFP și RFP, exprimate în sistem procariot și purificate, au fost testate singure sau în combinație cu un adjuvant model (hidroxid de aluminiu -Alum), urmărindu-se static (la intervale de timp fixe) și în dinamică (pe celule vii) captarea acestora de către celule dendritice derivate din măduvă osoasă murină (BMDC).

Faza 4: obținerea unor proteine fluorescente modificate pentru a putea fi folosite ca sonde FRET și testarea activității proteolitice a lizatelor celulare asupra sondelor FRET

Faza 5: testarea in vitro a livrării antigenelor model către celulele dendritice; evaluarea distribuției intracelulare a antigenelor model în funcție de sistemul de adjuvant folosit și evaluarea utilizării FRET pe celule pentru a monitoriza procesarea antigenului

În cadrul proiectului, a fost concepută o proteină de fuziune cu domenii intrinsec fluorescente (mCherry2) și activabile proteolitic (mNeonGreen2-1-10/mNeonGreen2-11) conținând situsuri de clivare pentru trombina și un epitop restricționat MHC-II (HA-tag). Ulterior, a fost exprimată în sistem procariot, purificată și modificată chimic prin marcarea cu un fluorocrom o proteină de fuziune fluorescentă bazată pe EGFP, a fost testată utilitatea acesteia ca sonda FRET și a fost demonstrată modificarea semnalului FRET sub acțiunea proteolitică a tripsinei sau a lizatelor celulare. Au fost optimizate metodele pentru monitorizarea prin microscopie în condiții fiziologice a captării și procesării antigenelor de către celulele dendritice derivate din măduvă osoasă, permițând evaluarea in vitro a diferitelor condiții de stimulare / adjuvantare asupra proceselor incipiente importante în dezvoltarea a răspunsului imun.

## **2.6. PN19140106 - Studii pentru evaluarea efectului imunomodulator și hepatoprotector al unor suplimente alimentare (SOD natural) asupra unor disfuncții metabolice**

Studii pentru evaluarea efectului imunomodulator și hepatoprotector al unor suplimente alimentare (SOD natural) asupra unor disfuncții metabolice a cuprins o serie de faze:

- Faza 1a-2019 - Caracterizarea biochimică a suplimentului alimentar SOD Natural;
- Faza 1b -2019 - Inducerea și caracterizarea de modele experimentale de sindroame metabolice induse de diete experimentale;
- Faza 2 – 2020 - Studiul efectelor imunomodulatoare și hepatoprotectoare ale SOD Natural (ca atare și/sau produs îmbunătățit) în hipercolesterolemie;
- Faza 3 – 2021 - Studiul efectelor imunomodulatoare și hepatoprotectoare ale SOD Natural (ca atare și/sau produs îmbunătățit) în hiperglicemie;
- Faza 4a – 2022 - Studiul efectelor administrării SOD Natural în sindrom dismetabolic cardiovascular;
- Faza 4b – 2022 - Studiul efectelor imunomodulatoare și hepatoprotectoare ale SOD Natural produs îmbunătățit în sindroame dismetabolice.

Faza 1a – 2019 - Obiectivul acestei faze a fost analiza biochimică a suplimentului alimentar SOD natural, pe baza activităților specifice, obiectivul fiind îndeplinit. Rezultatele concretizate în analiza complexă a suplimentului alimentar SOD natural, extract din orz verde, au evidențiat un produs complet și complex, bogat în elemente nutritive, aminoacizi, enzime antioxidative, minerale și aminoacizi esențiali. De asemenea, rezultatele arată lipsa de toxicitate a produsului și lipsa alergenilor de tipul glutenului.

Faza 1b -2019 - Obiectivul acestei faze a fost de evaluare a apariției sindroamelor metabolice propuse prin monitorizarea parametrilor clinici, biochimici și histologici la animalele cărora s-au administrat dietele purificate speciale. Rezultatele obținute prin administrarea de diete cu conținut crescut de colesterol (pentru inducere de ateroscleroză), fructoză (pentru inducerea de diabet tip II) și grăsime (pentru inducerea de obezitate) la șoareci (masculi și femele) evidențiază statistic inducerea sindroamelor metabolice.

Faza 2 -2020 - Obiectivul acestei faze a fost de inducere a sindromului metabolic hipercolesterolemic și administrarea de SOD natural preventiv și curativ pentru analiza posibilului

efect imunomodulator și hepatoprotector prin monitorizarea parametrilor clinici, biochimici, imunologici și histologici la 2 specii de animale (șoareci și șobolani). Rezultatele obținute prin administrarea de diete cu conținut crescut de grăsime (pentru inducerea de obezitate) la șoareci (masculi și femele) evidențiază inducerea sindroamelor metabolice, însă din analiza datelor nu putem afirma până în prezent decât că se confirmă un efect hepatoprotector al produsului SOD.

Faza 3 – 2021 - Obiectivul acestei faze a fost de inducere a sindromului metabolic hiperglicemic și administrarea de SOD natural preventiv și curativ pentru analiza posibilului efect hepatoprotector prin monitorizarea parametrilor clinici, biochimici și histologici la 2 specii de animale (șoareci și șobolani). Rezultatele obținute prin administrarea de diete cu conținut crescut de fructoză (pentru inducerea de hiperglicemie) la șoareci și șobolani (masculi și femele) evidențiază inducerea sindroamelor metabolice însă concludent doar la șoareci. Din analiza datelor putem afirma că se confirmă un efect hepatoprotector al produsului SOD la șoareci.

Faza 4a – 2022 - Obiectivul acestei faze a fost de inducere a sindromului dismetabolic cardiovascular și administrarea de SOD natural preventiv și curativ pentru analiza posibilului efect protector prin monitorizarea parametrilor clinici, biochimici și histologici la 2 specii de animale (șoareci și șobolani). Rezultatele obținute prin administrarea de diete cu conținut crescut de colesterol purificat (pentru inducerea sindromului aterosclerotic) la șoareci și șobolani (masculi și femele) evidențiază inducerea sindromului metabolic comparativ cu animalele martor. Din analiza datelor se observă o reducere a efectelor dietelor la șoarecii la care s-a administrat SOD ca și tratament în sindromul dismetabolic cardiovascular comparativ cu loturile martor tratate cu apă distilată.

Faza 4b - 2022. - Obiectivul acestei faze a fost de a realiza un produs îmbunătățit pornind de la SOD-ul natural.

Astfel, s-a realizat un produs compus din SOD natural + aronia + măr toate sub formă de extract. Analizele de laborator au evidențiat o capacitate antioxidantă mai mare de 3 ori a produsului îmbunătățit față de SOD natural. S-au creat loturi de șoareci la care s-au indus prin diete purificate sindroamele dismetabolice evaluate în anii anteriori și în acest an (obezitate, hiperglicemie și sindrom metabolic cardiovascular). După perioada de inducere, s-a administrat SOD, SOD îmbunătățit și apă distilată (lot control). S-au făcut monitorizări clinice, sanguine și histologice. Analiza datelor indică o evoluție pozitivă a loturilor tratate cu produsul îmbunătățit și o reducere a efectelor dismetabolice ale dietelor purificate.

## **2.7. PN19140107 - Dezvoltarea metodelor de fabricație și caracterizare a mediilor de cultură ce conțin derivate de sânge, pentru diagnostic microbiologic**

Proiectul a acoperit câțiva ani optimizând activitățile curente ale Institutului Cantacuzino în îmbunătățirea calității produselor.

În anul 2019 s-a urmărit optimizarea recoltării de sânge de la berbeci, bovine și cabaline și s-au stabilit protocoale de studiu, adaptate pentru cele 3 specii de animale utilizate.

În anul 2020 a avut loc optimizarea procesului de preparare a mediilor de cultură îmbogățit cu sânge provenit de la cele 3 specii de animale (ovine, bovine și cabaline) și repartizat în plăci Petri, precum și caracterizarea din punct de vedere al aspectului, pH, sterilitate.

În anul 2021, studiul a urmărit optimizarea procesului de preparare a mediilor de cultură îmbogățit cu sânge provenit de la cele 3 specii de animale (ovine, bovine și cabaline), repartizat în plăci Petri, precum și validarea tehnicilor de producție.

Pentru toate seriile de medii de cultură s-a realizat validarea tehnicilor de producție, de către Laborator Control Calitate, prin determinarea stabilității pe o perioadă de 2 luni.

Cele 3 specii de animale (ovine, cabaline, bovine) au manifestat rezistență la recoltarea de sânge, făcând față stresului procedurii și nu au prezentat semne de declin homeostatic per total, astfel că, în cazul în care cererea depășește capacitatea uzuală de furnizare, la indivizii cu caracteristici favorabile, sângerările se pot face și cu o frecvență mai ridicată.

S-a reușit prepararea și verificarea eficienței biologice a loturilor experimentale de medii de cultură cu sânge defibrinat provenit de la cele 3 specii de animale (ovine, bovine și cabaline) utilizând tulpini bacteriene din colecția I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”.

A fost optimizat procesul de preparare a mediilor de cultură îmbogățit cu sânge provenit de la cele 3 specii de animale (ovine, bovine și cabaline), repartizat în plăci Petri, precum și validarea tehnicilor de producție.

Rezultatele obținute în ultima fază au demonstrat îmbunătățirea procesului de fabricație și performanța mediilor de cultură ce conțin derivate de sânge: geloza cu sânge de berbec defibrinat și geloza cu sânge bovin defibrinat.

Loturile experimentale de tip ready to use de medii geloza cu sânge de berbec defibrinat și geloza cu sânge bovin defibrinat analizate în studiu, au prezentat stabilitate microbiologică și biologică (sterilitate și eficiență) pentru o perioadă de 2 luni de la data preparării, în condiții de stocare de 5°C ±3°C.

Rezultate științifice și tehnologice obținute în acest studiu pot fi utilizate în asimilarea în microproducție a mediilor geloza cu sânge de berbec defibrinat și geloza cu sânge bovin defibrinat.

Proiectul poate fi continuat prin studiul privind stabilitatea și performanța altor tipuri de medii cu adaos de sânge.

## **2.8. PN19140108 - Caracterizare a complexelor proteice prin metode cromatografice și proteomice avansate în scopul identificării relației structură funcție în răspunsul imun**

Fazele de dezvoltare ale proiectului au cuprins:

În faza întâi a proiectului PN 19 14 0108 s-a urmărit documentarea în scopul pregătirii componentelor necesare expresiei in vitro și realizarea unor teste de exprimare a proteinelor recombinante.

În faza IIa a proiectului PN 19 14 0108 s-a avut în vedere expresia proteinelor recombinante și inițierea purificării.

În etapa IIb a proiectului PN 19 14 01 08 s-a lucrat la optimizarea condițiilor de sinteză și purificare a proteinelor recombinante Liz-MPT și Liz-CFP precum și analiza produșilor obținuți.

În etapa III s-a realizat legarea proteinei EGFP cu și fără HisTag (o coadă de 6 histidine) la pH 3,5 de un adjuvant de tip ulei în apă ce conține squalen cuplat cu fosfatidilcolină. Complexele formate au fost supuse ulterior mai multor pH-uri pentru a le verifica stabilitatea. Particulele au fost purificate folosind rășini combinate de tip Capto Core (Cytiva) și supuse analizelor prin împrăștierea dinamică a luminii (DLS) și SDS-PAGE atât înainte cât și după schimbarea pH-ului.

Au fost analizate sistemele de expresie in vitro descrise în literatura de specialitate și, dat fiind timpul scurt disponibil pentru faza I a proiectului PN 19 14 0108 (4,5 luni), s-a optat pentru achiziționarea și utilizarea unor kituri pentru realizarea expresiei in vitro a proteinei de suprafață a bacteriei *Micobacterium tuberculosis* MPT64 cu codoni optimizați pentru *E. coli*, în mai multe variante: nativă, fuzionată cu o „coadă” de 6 Histidine sau 6 Lizine cu și fără codoni optimizați pentru expresia în *E. coli*. În paralel s-au realizat și experimente in vivo cu utilizarea tulpinii de *E. coli* BL21(DE3). Constructele folosite au fost clonate în cadrul proiectului PN 16 39 02 03 „Un nou sistem de complex antigen-adjuvant model experimental pentru tuberculoză.”

Expresia în sistem procariot este o metodă adecvată de sinteză a proteinelor recombinante pentru obținerea cantităților mari. Totuși, nivelul de expresie variind de la o proteină la alta, pentru a putea obține un raport bun cantitate / calitate, este necesară stabilirea empirică a condițiilor de exprimare. În urma experimentelor efectuate într-un timp scurt s-au obținut cantități medii de proteină. În cadrul cromatografiei pe schimbători de cationi proteinele s-au purificat în proporție de peste 80%. O îmbunătățire ar putea-o aduce aplicarea unei cromatografii de exclusiune sterică.

În etapa IIb a proiectului PN 19 14 01 08 s-a realizat optimizarea expresiei și purificării proteinelor recombinante Liz-MPT și Liz-CFP. Astfel, s-a obținut o cantitate destul de mare de proteină de puritate ≥90%, ale cărei secvențe au fost confirmate prin spectrometrie de masă. S-a observat că Liz-MPT este stabilă timp de cel puțin 4 luni atât la frigider, cât și la congelatorul de -20°C.

De asemenea, s-a realizat sinteza proteică în sistem acelular a proteinelor EGFP și TurboRFP fără utilizarea kiturilor comerciale, pornind de la lizat bacterian. Acestea vor avea rolul de control pozitiv în experimentele următoare.



În etapa III s-a reușit dezvoltarea unei metodologii de analiză a complexelor proteică – adjuvant bazate pe metode analitice ca împrăștierea dinamică a luminii și SDS-PAGE, combinate cu modificări de pH și purificări ale particulelor folosind rășini combinate de tip Capto Core (Cytiva).

## **2.9. PN19140201 - Sistem de avertizare în timp real al riscului epidemiologic arboviral pentru zona București**

Faza I: Obiectivul primei etape a proiectului de cercetare a fost identificarea și delimitarea cartografică a diferitelor tipuri de zone urbane din jumătatea de sud a capitalei (sectoarele 3, 4 și 5) precum și stabilirea metodologiei de lucru pentru restul perioadei de derulare a proiectului. La nivelul părții de sud a capitalei au fost identificate șapte categorii de zone cu potențial diferit în menținerea și amplificarea circulației virusului West Nile:

- 1) Zone virane;
- 2) Zone de gospodării individuale (case);
- 3) Zone de locuințe cu administrare în comun (blocuri);
- 4) Zone verzi (parcuri);
- 5) Zone de sere;
- 6) Zone industriale;
- 7) Zone de clădiri comerciale sau aflate în administrația autorităților.

Clasificarea diferitelor tipuri de zone urbane s-a realizat prin analiza imaginilor satelitare corelată cu analiza vizuală din teren. Analiza în teren compensează faptul că imaginile satelitare de tip 'freeware' nu sunt întotdeauna de dată recentă. Pe de altă parte, vizualizarea la fața locului ajută și la decizia asupra locurilor de amplasare ulterioară a capcanelor entomologice. Metodologia de colectare a culicidelor și de testare a acestora a fost de asemenea stabilită îndeplinindu-se astfel în întregime obiectivul propus.

Faza II: Obiectiv: Estimarea în timp real a valorilor indicilor zonali de risc epidemic cu virus West Nile în zona de sud a capitalei (sectoarele 3, 4 și 5) și evaluarea eficienței măsurilor de control entomologic aplicate în această zonă.

În această fază, circulația virusului West Nile a fost supravegheată în 9 situri din zona stabilită de studiu (sectoarele 3, 4 și 5) și în încă două suplimentare (unul în sectorul 1 și unul în sectorul 6). Un număr de 15 probe constituite din țânțari colectați în 4 din cele 11 situri supravegheate au fost pozitive pentru virusul West Nile. Cele patru situri pozitive au fost: Parcul Cuza, Parcul Titan, Curtea institutului Cantacuzino (IC) și Strada Bacău. Pentru aceste zone a fost calculat Indicele Zonal de Risc. Prima etapă a acestei faze a constat în alegerea siturilor de colectare a culicidelor. După extracție, probele au fost analizate pentru prezența virusului West Nile prin tehnica Real Time RT-PCR utilizând truse comerciale (Saccace Biotechnologies). Probele găsite pozitive au fost secvențiate pentru identificarea moleculară a tulpinilor circulante de virus West Nile. Pentru siturile găsite pozitive s-a calculat Indicele Zonal de Risc (IZR) în vederea încadrării zonelor respective în clasele definite de risc. În urma informării din partea societății municipale Eco Igienizare București a datelor și zonelor de efectuare a dezinsecțiilor și prin monitorizarea permanentă a dinamicilor populațiilor de vectori, s-a putut aprecia eficiența măsurilor de combatere aplicate. Singurul neajuns al implementării acestei faze a proiectului este reprezentat de perioada destul de mare (două săptămâni) de la colectarea culicidelor infectate cu virus West Nile până la aplicarea măsurilor de control. În rest, putem spune că obiectivul fazei a doua a proiectului de cercetare a fost pe deplin realizat.

Faza III: Obiectivul fazei a treia a proiectului de cercetare a fost identificarea și delimitarea cartografică a diferitelor tipuri de zone urbane din jumătatea de nord a capitalei (sectoarele 1, 2 și 6) precum și stabilirea siturilor de lucru pentru supravegherea entomologică ulterioară.

A fost definitivată harta tipurilor de zone urbane pentru întreaga suprafață a orașului București, atingându-se astfel în întregime țintele propuse pentru această fază a proiectului. Totodată, s-a reușit stabilirea unui număr reprezentativ de situri de colectare a culicidelor pentru ca activitățile fazei a patra să poată începe fără întârziere și ca monitorizarea în timp real a parametrilor epidemiologici să urmeze a se desfășura nu doar în zona de nord a orașului, așa cum prevedea planul inițial al proiectului, ci la nivelul întregii capitale.

Deși planul inițial pentru următoarea fază a proiectului prevedea eșantionarea și evaluarea riscului epidemiologic arboviral doar a zonei de nord a capitalei, am considerat necesar ca supravegherea entomologică să se facă pe o zonă cât mai largă la nivelul orașului, pentru a putea obține date necesare optimizării sistemului de avertizare pe care dorim să îl dezvoltăm și să îl implementăm.

Faza IV: Obiectiv: Estimarea în timp real a valorilor indicilor zonali de risc epidemic cu virus West Nile în zona de nord a capitalei (sectoarele 1, 2 și 6) și emiterea timpurie către autorități de avertizări asupra zonelor de risc epidemic arboviral. S-a avut în vedere reducerea timpului dintre colectarea culicidelor și diagnosticul molecular al probelor pentru a putea emite avertizări asupra zonelor de risc, înaintea apariției cazurilor umane. Activitățile de colectare a culicidelor s-au desfășurat în 16 locații, în perioada iunie – septembrie.

Au fost constituite 492 de probe însumând 18.387 femele de țânțari. Toate probele au fost testate pentru prezența virusului West Nile și doar o parte dintre acestea au fost testate și pentru prezența virusului USUTU. S-au înregistrat 14 probe pozitive (din opt zone) pentru virusul West Nile și niciuna pentru virusul Usutu. Toate probele pozitive pentru virusul West Nile au fost constituite din femele aparținând speciei *Culex pipiens* s.l. Primele probe pozitive de virus West Nile s-au înregistrat în zona lacului Fundeni (8-10 iulie) și pe strada Bacău (10 -14 iulie). La data de 22 iulie au fost informate asupra zonelor de risc următoarele instituții: Institutul Național de Sănătate Publică, Primăria Municipiului București și Compania Municipală Eco-Igienizare București. Pe întreg sezonul de supraveghere vectorială au fost emise către instituțiile amintite mai multe informări oficiale asupra zonelor cu potențial epidemic. Un singur caz uman de infecție cu virus West Nile s-a înregistrat în acest an în capitală. Prin prisma rezultatelor obținute, putem spune că nivelul de implementare a depășit obiectivul inițial propus pentru această fază.

Faza V: Obiectiv: Realizarea hărții integrative GIS pe tipuri de zone de risc a municipiului București în anul 2021 au fost identificate 4 zone de risc epidemic de infecții cu virus West Nile la nivelul capitalei. Delimitarea cartografică a acestora a fost efectuată, colorația lor făcându-se în raport cu gradul de risc estimat. Pentru delimitarea diferitelor zone de risc epidemic de infecție cu virus West Nile la nivelul capitalei, pentru realizarea hărții GIS, am realizat supravegherea entomologică în 15 situri de interes. Pentru reducerea timpului necesar diagnosticului arboviral, am optat pentru testarea probelor de culicide prin metoda de screening RAMP (Rapid Analyte Measurement Platform, Response Biomedical Corporation, Burnaby, British Columbia, Canada) și doar probele pozitive au făcut obiectul confirmării prin metoda moleculară RT-PCR. Doar probele pozitive confirmate RT-PCR au fost luate în considerare la stabilirea zonelor de risc epidemiologic. Autoritățile (Institutul Național de Sănătate Publică și Primăria Capitalei) au fost înștiințate imediat după confirmarea PCR a fiecărei probe pentru implementarea urgentă a măsurilor de control a vectorilor în vederea limitării riscului epidemic. Totodată, pe baza analizei rezultatelor obținute până la momentul respectiv, am concluzionat că nu există zone de risc epidemiologic arboviral stabile în timp, amplificarea virală realizându-se în zone 'aleatorii' de la an la an și chiar la durate mai scurte de timp, în funcție de parametrii spațio-temporali greu de prezis anticipat. De aceea, nu se poate realiza o hartă de tip „high-resolution” a zonelor de risc epidemiologic arboviral cu valabilitate multianuală, la nivelul geografic al unui oraș, fără ca unele zone să nu își păstreze valoarea de risc, iar în cazul altora aceasta să fie subevaluată. Se impune astfel, pentru menținerea unui sistem valid de avertizare timpurie asupra zonelor de risc epidemic, ca evaluarea zonelor de risc prin determinarea în timp real a parametrilor corespunzători, să se facă anual în perioada de circulație activă a virusului.

Putem spune ca obiectivul acestei faze a fost în mare parte realizat.

Faza VI: Obiectiv: Estimarea și clasificarea în timp real a zonelor metropolitane în categorii de risc epidemic, evaluarea acurateții predicțiilor și ajustarea valorilor parametrilor luați în considerare în vederea optimizării sistemului de avertizare și validarea acestuia ca sistem funcțional. Simpla delimitare a unor zone de risc nu este suficientă fără a estima și lua în considerare, nivelul de risc al fiecărei zone, nivel ce are un grad accentuat de relativitate temporară, zonele de risc având un caracter tranzitoriu. Pentru estimarea cantitativă a riscului epidemiologic noi am definit un parametru calculabil pe care l-am numit Indice Zonal de Risc (IZR). Am stabilit valoarea acestui parametru ca produs al altor doi parametri măsurabili: Rata Minima de Infecție (MIR) a populațiilor de culicide și Abundența lor (Ab) exprimată ca medie de colectare per zi / capcană.

Această fază a mers în paralel cu faza anterioară, având aceleași activități. Spre deosebire de faza V care a generat o hartă cu indicație sezonieră ale cărei valori s-au calculat ca medie ale celor lunare,

în această fază au fost generate hărți lunare cu delimitarea în timp real a zonelor cu potențial diferit de risc epidemic, obiectivul fazei fiind atins.

Faza VII: Obiective: Lansare website sistem de avertizare și informarea autorităților competente în vederea colaborării (municipalitate, direcția de sănătate publică)

Pagina web a proiectului a fost realizată putând fi accesată la <https://cantacuzino.mapn.ro/pages/proiecte-de-cercetare>. Fiind un proiect instituțional, nu am putut realiza un website aparte. De aceea, am recurs la varianta ca sistemul de avertizare să fie prezent pe websiteul I.N.C.D.M.M., „Cantacuzino”. Pe pagina web respectivă am detaliat scopul proiectului, metodologia de lucru, precum și rezultatele anuale obținute. În ceea ce privește informarea autorităților competente, acestea au fost informate despre activitatea proiectului încă de la începutul acestuia, în fiecare an fiind înștiințate de către noi asupra zonelor de circulație activă a virusului West Nile din capitală, atât municipalitatea cât și Institutul Național de Sănătate Publică.

În urma înștiințărilor anuale repetate a autorităților asupra activităților realizate în cadrul proiectului, a fost stabilit un protocol de colaborare instituțională între Primăria Municipiului București, I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, Direcția de Sănătate Publică și Asociația de Dezvoltare Intercomunitară pentru Deratizare, Dezinsecție, Dezinfecție București privind, printre altele, măsurile de dezinsecție. Acest protocol a fost aprobat prin Hotărârea Consiliului General al Municipiului București numărul 185 din 30.03.2022. Astfel, obiectivele fazei a VII-a au fost pe deplin atinse.

Faza VIII: Cum am menționat și la activitățile fazei anterioare, autoritățile (INSP, PMB) au fost înștiințate oficial despre dezvoltarea sistemului de avertizare încă din primul an de implementare a proiectului. În ceea ce privește evaluarea eficienței măsurilor de control adoptate de societatea însărcinată cu efectuarea serviciului de dezinsecție, rapoartele de evaluare au fost trimise doar către aceasta.

Obiectivul fazei a VIII-a (punerea oficială în lucru a sistemului de avertizare) a fost, de asemenea, atins odată cu obiectivele fazei a VII-a.

## **2.10. PN19140202 - Analiza microbiotei intestinale în condiții de sănătate și boală: studiu pilot bazat pe secvențierea cu înalt randament**

În cadrul proiectului au fost realizate studii privind compoziția microbiotei intestinale pentru loturi de indivizi autohtoni și au fost puse la dispoziția laboratoarelor de referință proceduri operaționale bazate pe recomandări internaționale, pentru implementarea acestor metode de analiză în practica curentă a laboratoarelor. Obiectivul general al PN 19 14 02 02, și anume, implementarea în laboratorul de referință microbiologică din România a analizei metagenomice bazate pe tehnologia de secvențiere cu înalt randament în vederea îmbunătățirii cunoștințelor referitoare la biodiversitatea microbiotei indivizilor autohtoni, prin activități care vizau extinderea portofoliului de tehnici moleculare al laboratoarelor de referință din România și alinierea analizei microbiologice la standardele solicitate laboratoarelor din Comunitatea Europeană de European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) precum și obținerea de date de referință privind compoziția microbiotei intestinale pentru un lot de indivizi din populația autohtonă, a fost atins în totalitate.

Faza I – În această fază au fost testate mai multe metode de stocare materii fecale și moduri de extracție a ADN bacterian în vederea secvențierii metagenomului și determinarea unui profil al microbiotei intestinale umane. Pentru atingerea obiectivului acestei faze au fost studiate probe de materii fecale, au fost testate 3 moduri de stocare și 2 metode de extracție ADN bacterian, în total fiind realizate 6 proceduri diferite. Secvențierea bibliotecilor ADN s-a realizat cu ajutorul platformei PGM Ion Torrent. În urma analizei rezultatelor, a fost aleasă procedura cu cele mai bune rezultate și care a fost folosită în etapele următoare. Un cercetător a participat la un workshop de instruire în utilizarea soft-ului SeqSphere.

Faza a II-a – S-a realizat implementarea metodei de obținere a profilului metagenomic bacterian prin secvențierea genei ADNr 16S utilizând tehnologia Ion Torrent (metaprofilare). Au fost realizate două proceduri operaționale standard care vor putea fi utilizate la nivelul întregului institut. Au fost înregistrate primele date de metaprofilare în asociere cu o condiție de boală ca suport pentru înțelegerea interacțiunii microbiotă – gazdă. În această etapă, s-a evaluat diversitatea bacteriană a microbiotei intestinale la pacienții cu spondilită anchilozantă versus persoane fără patologii cunoscute.

A fost constituită o bază de date care cuprinde informații despre profilul microbiotei intestinale la persoane sănătoase versus persoane cu diagnosticul de spondilită anchilozantă. Doi cercetători au participat la Conferința de Microbiologie și Epidemiologie 2020, susținută on-line. Acestea au prezentat aspecte legate de patogeni prezenți în microbiota fecală. De asemenea, rezultatele din această etapă au fost prezentate la Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” 2020, prin posterul „Microbiota fecală a pacienților cu spondilită anchilozantă”, care a primit premiul I.

Pentru armonizarea laboratorului de referință cu recomandările europene, un cercetător a participat la un workshop de instruire în utilizarea soft-ului SeqSphere, utilizat pentru analiza de genom întreg, conform recomandărilor ECDC.

Faza a III – A fost secvențiat genomul norovirusului provenit dintr-o epidemie recentă (2021) din județul Brașov. Au fost investigate, prin secvențierea întregului genom, tulpini de Salmonella, Escherichia, Shigella, izolate din cazuri sporadice și din focare epidemice, punându-se în evidență factori de virulență și rezistență la antibiotice și au fost stabilite legături filogenetice între acestea. A fost elaborată o procedură operațională specifică: „Obținerea de biblioteci ADN pentru secvențierea întregului genom bacterian utilizând platforma Ion Torrent PGM”. Rezultatele din această etapă au fost diseminate la Sesiunea Științifică Aniversară a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” 2021 „100 de ani în slujba sănătății”, prin prezentarea orală a trei lucrări științifice. De asemenea, diseminarea rezultatelor s-a realizat prin publicarea articolului ”A Snapshot of the Genetic Diversity of Salmonella Enteritidis Population Involved in Human Infections in Romania Taken in the European Epidemiological Context” în revista Pathogens 2021, 10, 1490. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111490>. Factor de impact 4,531

Faza a IV-a – S-a realizat secvențierea întregului metagenom din probe de materii fecale (metoda metagenomic shotgun), pentru a putea explora atât diversitatea bacteriană, cât și conținutul în gene de virulență și rezistență la antibiotice. Au fost puse în evidență diverse caracteristici ale metagenomului și a fost stabilit un algoritm de lucru, astfel încât, atunci când va fi nevoie de identificarea unor patogeni necultivabili care nu au putut fi puși în evidență prin alte metode, să se poată aplica această metodă. S-a continuat secvențierea și analiza datelor pentru izolatele de Escherichia coli producător de toxină Shiga (STEC) și a fost inițiat un draft pentru publicarea rezultatelor analizei întregului genom. Au fost obținute secvențe de genom întreg pentru nouă izolate Campylobacter jejuni ST824, care au fost analizate și a fost inițiat un draft pentru publicarea rezultatelor. A fost trimis către evaluare în vederea publicării în revista Viruses articolul “Genome Characterisation of Norovirus GII.P17-GII.17 Causing a Large Gastroenteritis Outbreak in Romania, 2021”, bazat pe analiza efectuată în etapa a III-a a acestui proiect. A fost publicat articolul “An insight into the fecal microbiota composition in Romanian patients with ankylosing spondylitis using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing” în Revista Română de Medicină de Laborator. Au fost susținute două comunicări orale la Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, pentru a prezenta rezultatele obținute în cadrul proiectului.

## **2.11. PN19140203 - Dezvoltarea metodelor utilizate pentru diagnosticul tusei convulsive în scopul evaluării riscului apariției unei epidemii ca rezultat al lipsei imunizării specifice**

Pentru îndeplinirea obiectivelor proiectului, au fost realizate următoarele activități:

În scopul determinării titrului de anticorpi anti-toxină pertussis, anti-hemaglutinină și anti-pertactină în ser, au fost implementate protocoale pentru reacția ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

S-a elaborat protocolul de extracție a ADN-ului genomic folosind extractorul semiautomat și kitul de extracție din exsudate nazofaringiene.

S-a elaborat protocolul de amplificare a ADN-ului de Bordetella pertussis și identificarea directă a acestuia în prelevate. Acest lucru s-a realizat prin utilizarea tehnologiei de amplificare izotermă a materialului genetic, folosindu-se ca țintă o regiune de 198 perechi baze a elementului de inserție IS481 din genomul Bordetella sp. Un produs secundar al amplificării este pirofosfatul de magneziu, care formează un precipitat alb, modificând caracteristicile de absorbantă ale probei.

S-a realizat identificarea Bordetella pertussis prin spectrometrie de masă Maldi-Tof, tehnică utilizată în domeniul biologiei și biochimiei pentru analiza proteinelor, peptidelor, oligonucleotidelor. S-a realizat identificarea moleculară a genelor codificatoare ale factorilor de virulență: promotorul

toxinei pertussis (ptxP), subunitatea structurală a toxinei pertussis (ptx S1), proteinele fimbriale (fim2 ; fim3) și proteina pertactină (prn) și au fost optimizate protocoalele de lucru.

Pentru a pune în evidență expresia antigenelor de virulență la *Bordetella pertussis*, s-a implementat o tehnică de lucru (ELISA) bazată pe utilizarea anticorpilor monoclonali. Aceștia se atașează specific la anumiți epitopi ai toxinei pertussis (PT), hemaglutininei filamentoase (FHA), pertactinei (PRN) și proteinelor fimbriale (Fim2 și Fim3).

S-a pus la punct identificarea ADN-ului bacterian de *Bordetella pertussis*/ *B. parapertussis*/*B. bronchiseptica* din produsul patologic, prin reacția Real-Time PCR multiplex detectând ținte specifice și au fost comparate rezultatele cu cele obținute pe ADN extras din cultură, metoda având specificitate și sensibilitate ridicată.

Tulpini de *Bordetella pertussis* au fost comparate din punct de vedere al profilului de macrorestricție enzimatică, fiind astfel dezvoltată metoda PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), bazată pe digestia ADN-ului bacterian, folosind enzima de restricție Xba I.

Obiectivele proiectului au fost integral îndeplinite. Au fost dezvoltate metode directe și indirecte aplicate în diagnosticul tusei convulsive și metode de caracterizare a tulpinilor de *Bordetella pertussis*.

## **2.12. PN19140204 - Dezvoltarea unor metode avansate pentru detecția, identificarea și caracterizarea patogenilor emergenți, cu aplicabilitate în sănătatea publică și biosecuritate**

Rezultatele urmărite a fi obținute în cadrul proiectului sunt reprezentate de introducerea în practica de laborator curentă a unor metode de detecție și identificare a unor agenți patogeni virali și bacterieni emergenți/re-emergenți. Caracterizarea prin metode moleculare a agenților virali și bacterieni detectați cu ajutorul metodelor moleculare dezvoltate în cadrul proiectului va conduce la creșterea capacității de detecție și răspuns rapid în situații epidemiologice determinate de virusuri transmise prin vectori și de bacterii transmise prin mediu (*Legionella*).

În faza I au fost introduse și optimizate câteva metode de diagnostic molecular pentru detecția și identificarea unor flavivirusuri și bunyavirusuri de interes pentru sănătatea publică în țara noastră. Au fost selectați primeri și sonde moleculare cu specificitate de gen (genul *Flavivirus*) și respectiv de tip viral (principalele tipuri de flavivirusuri și bunyavirusuri de interes pentru sănătatea umană). Am dezvoltat câteva metode de biologie moleculară pentru detecția rapidă și identificarea principalelor genuri de virusuri transmise de artropode din familia *Flaviviridae* și Ordinul *Bunyavirales*. Metodele se bazează pe utilizarea tehnicilor RT-PCR și real-time-RT-PCR cu primeri și sonde moleculare cu specificitate pentru principalele genuri de virusuri transmise de artropode: flavivirusuri și bunyavirusuri.

În faza II a proiectului s-a analizat diversitatea genetică a tulpinilor de *Legionella pneumophila*, care circulă în mediu în România, folosind metoda de tipizare moleculară SBT-sequence based typing. Cunoașterea tipurilor de secvențe (genotipurilor) de *L. pneumophila* existente în țara noastră va furniza informații importante privind potențialul de patogenitate, ceea ce va conduce la un mai bun management al riscurilor asociate cu transmiterea infecției la populația susceptibilă. Rezultatele obținute privind prezența tulpinilor de *L. pneumophila* cu potențial patogen pentru populația din România sunt utile pentru informarea autorităților de sănătate publică, a responsabililor care asigură întreținerea și managementul instalațiilor de apă din diferite instituții privind riscul de contaminare, factorilor de decizie politică, cu scopul creșterii gradului de conștientizare și pentru fundamentarea planurilor de prevenire și control a infecției utilizând metoda SBT pentru analiza genotipurilor unor tulpini de *L. pneumophila*, care circulă în mediu în România, pentru stabilirea diversității genetice a acestora și a gradului de înrudire genetică cu genotipuri ale izolatelor din alte țări. Rezultatele acestui studiu, în premieră pentru România, arată că *L. pneumophila* este o bacterie prezentă în diferite sisteme de apă ale unor clădiri private/publice din România, însă nu putem să corelăm prezența acestora cu apariția unor cazuri de îmbolnăvire umană, deoarece până în prezent nu au fost izolate tulpini clinice, deși au fost diagnosticate cazuri de legioneloză, fie prin detecția antigenului urinar de *L. pneumophila* Sg. 1 sau prin PCR.

În faza III a proiectului s-au optimizat două teste de RT-PCR cuplate cu secvențierea ampliconilor obținuți pentru detecția și identificarea flavivirusurilor și a bunyavirusurilor de interes pentru sănătatea publică. Metodele de detecție și identificare a arbovirusurilor dezvoltate în fazele I și III ale proiectului

stau la baza validării unei metodologii de lucru pentru depistarea rapidă a riscului biologic determinat de virusurile transmise prin vectori, atât cunoscute, cât și a unor arbovirusuri noi, emergente de importanță medicală.

În detaliu, testele optimizate au cuprins:

- o metodă de biologie moleculară utilă pentru detecția și identificarea genomului de flavivirus, care poate fi utilizată pentru testarea unei probe biologice de la un caz suspect de infecție cu un flavivirus necunoscut, deoarece reacția RT-PCR este cuplată cu secvențierea ampliconului obținut, iar analiza filogenetică a acestuia permite identificarea tipului de flavivirus prezent în proba biologică a pacientului;

- o metodă bazată pe RT-PCR și secvențiere pentru detecția și identificarea tipului de bunyavirus din genurile Phlebovirus, Nairovirus și Orthobunyavirus din probe biologice ale persoanelor cu suspiciune de infecție cu un bunyavirus cunoscut sau nu.

Aceste protocoale de detecție moleculară sunt adecvate pentru detecția și identificarea genomului unui tip de flavivirus și respectiv de bunyavirus pe care îl suspectăm pe baza datelor clinice și epidemiologice ale cazului suspect de infecție cu un arbovirus cunoscut sau nou, emergent.

În faza IV a proiectului s-a introdus metoda de identificare rapidă a speciilor de Legionella în rândul izolatelor de mediu, bazată pe spectrometria de masă tip MALDI TOF. A fost astfel optimizată o metodă rapidă, ieftină de identificare a izolatelor de Legionella din probe de apă, bazată pe spectrul de proteine identificat cu ajutorul MALDI-TOF MS. Tehnica salvează o cantitate considerabilă de materiale și timp necesare identificării tulpinilor de Legionella din probe de apă conform standardului ISO11731-2. De asemenea, metoda furnizează informații despre diferitele specii de Legionella izolate din sistemele de apă potabilă într-un timp scurt (câteva minute).

În faza V a proiectului s-au introdus și optimizat câteva metode de diagnostic molecular pentru detecția și identificarea unor alphavirusuri și poxvirusuri de interes pentru sănătatea publică, cum ar fi virusul variolei maimuței, care în anul 2022 a devenit un agent patogen de interes internațional. Astfel, în data de 23 iunie 2022, directorul general al OMS a declarat că escaladarea focarului global de variolă a maimuței este o urgență de sănătate publică de interes internațional (PHEIC), virusul variolei maimuței fiind responsabil până în 22 noiembrie 2022 de apariția a 81.095 cazuri. Au fost optimizate teste real-time RT-PCR și real-time PCR pentru detecția și identificarea alphavirusurilor și orthopoxvirusurilor de interes pentru sănătatea publică. Metodele de detecție și identificare a arbovirusurilor dezvoltate în această fază a proiectului stau la baza validării unei metodologii de lucru pentru depistarea rapidă a riscului biologic determinat de virusurile transmise prin vectori, atât cunoscute, cât și a unor arbovirusuri noi, emergente, de importanță medicală.

În faza VI a proiectului a fost validată metoda bazată pe identificarea profilului proteic cu ajutorul spectrometriei de masă de tip MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) pentru identificarea speciilor de Legionella prezente în probele de mediu din diferite tipuri de instalații de apă din România. Metoda validată este o metodă rapidă, cost-eficientă, specifică și va putea fi utilizată în practica curentă a laboratorului, la testele de izolare și identificare a bacteriei Legionella în probele de apă prelevate din diferite surse de mediu cu risc crescut de contaminare cu Legionella pentru a furniza un rezultat rapid și de încredere.

În faza VII s-a introdus metoda de secvențiere a întregului genom (WGS) pentru caracterizarea izolatelor din clinică și de mediu de Legionella pneumophila în cadrul anchetelor epidemiologice pentru stabilirea sursei de infecție. A fost aplicată o metodă de tipizare genetică de performanță superioară SBT, reprezentată de secvențierea de nouă generație – NGS - next-generation sequencing, care va permite caracterizarea întregului genom bacterian și va conduce la stabilirea cu rezoluție maximă a relațiilor de înrudire filogenetică și epidemiologică între izolatele responsabile de cazuri/clustere/focare de legioneloză.

Scopul final al dezvoltării și optimizării metodelor moleculare a fost atins. Astfel, s-au putut valida metodologii de lucru pentru depistarea rapidă a riscului biologic determinat de virusuri transmise prin vectori, precum și pentru identificarea și caracterizarea izolatelor de Legionella.

### **2.13. PN19140205 - Modele avansate pentru evaluarea formării și comportamentului dinamic al biofilmelor bacteriene, în prezența și absența substanțelor antimicrobiene**

În cadrul proiectului au fost elaborate protocoalele pentru dezvoltarea și detecția biofilmului bacterian, conform planului de realizare.

Au fost caracterizate complet, prin secvențierea întregului genom (WGS), un număr de 18 tulpini de *Staphylococcus aureus*. Au fost selectate și testate la colistin 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 17 tulpini de *Acinetobacter baumannii*, 9 tulpini de *Klebsiella pneumoniae* și 4 tulpini de *Escherichia coli* prin metoda godeurilor în plăci și metoda Calgary a populațiilor planctonice și sesile. Au fost elaborate și optimizate diferite reacții de polimerizare în lanț (PCR) necesare caracterizării tulpinilor bacteriene. A fost evaluată activitatea antimicrobiană a 12 compuși chimici obținuți prin complexarea a 2 liganzi cu câte 6 ioni metalici diferiți, față de 5 bacterii (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Acinetobacter baumannii* (izolat clinic) și *Bacillus cereus* ATCC 11778) și 3 fungi levurici (*Candida albicans* ATCC 10231 IC249, *Candida krusei* IC190 și *Cryptococcus neoformans* IC231), compuși chimici sintetizați în cadrul Disciplinei de Chimie generală și anorganică a Facultății de Farmacie din UMF „Carol Davila” București și primiți în baza convenției de colaborare încheiată cu Facultatea de Farmacie din UMF „Carol Davila” București. S-au primit la Laboratorul Infecții Nosocomiale și Rezistente la Antibiotice

(INRA), de la 3 spitale din România (2 din București și unul din Bacău), atât bacterii Gram pozitive, cât și Gram negative, iar după confirmarea acestora au fost parțial caracterizate și stocate în bulion Brain Heart Infusion (BHI) cu glicerol sau criotuburi cu biluțe, la -80 grade C, în vederea dezvoltării colecției de tulpini bacteriene a laboratorului INRA din I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” pentru caracterizarea ulterioară și pentru utilizarea acestora ca martor pozitiv în diferite reacții PCR, experimente și realizarea de studii prospective și retrospective cu impact în sănătatea publică.

S-au optimizat metodele de detecție a biofilmelor bacteriene prin metoda plăcilor cu godeuri și metoda Calgary pe tulpini standard, de referință (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Staphylococcus aureus* BAA-1026, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* GOI1153754-03-14, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299) și pe tulpini clinice (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*) izolate de la pacienți și a constat în realizarea mai multor experimente, prin schimbarea diferiților parametri (ex. mediul de cultură, modul de incubare – static sau cu agitare). De asemenea, au fost optimizate mai multe reacții de polimerizare în lanț (PCR) pentru gene implicate în formarea biofilmului bacterian, în virulență și în rezistență la antibiotice, reacții necesare caracterizării complexe a tulpinilor bacteriene luate în studiu.

S-a testat sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor bacteriene luate în studiu, prin metoda disc difuzimetrică Kirby Bauer, utilizând discuri Oxoid.

Totodată, a fost completată documentația pentru colectarea tulpinilor bacteriene din spitalele civile, după discuțiile purtate cu responsabilii studiului și anume, convențiile de colaborare pentru spitalele care au răspuns invitației noastre de a participa activ la realizarea acestui proiect (din 12 spitale civile, au răspuns 4), protocolul de studiu și fișa standard de însoțire a tulpinilor bacteriene.

S-au elaborat protocoalele pentru detecția biofilmelor bacteriene prin metoda deschisă utilizând reactorul CDC și prin metoda Zurich Burn Biofilm.

### **2.14. PN19140206 - Dezvoltarea strategiei de supraveghere a infecțiilor cauzate de virusurile respiratorii bazată pe tehnici de laborator eficiente pentru diagnostic, cu rol important în limitarea epidemiilor sau pandemiilor**

Infecțiile respiratorii virale reprezintă una dintre principalele cauze de morbiditate și mortalitate la nivel mondial, atât la copii cât și la adulți. Perioada de circulație a virusurilor poate fi diferită pe parcursul anului, de exemplu: circulația virusurilor gripale este predominantă în sezonul rece, virusurile non-gripale toamna/primăvara, SARS-CoV-2 (cu valuri epidemice) pe tot parcursul anului. Perioada de vară este caracterizată de circulația enterovirusurilor și episoadele epidemice (cum ar fi

rujeola/rubeola) se pot succeda la intervale de câțiva ani datorită importului diferitelor tulpini circulante. Infecțiile produse de virusurile respiratorii pot provoca boli cu simptome respiratorii de intensitate variabilă, pornind de la simptomele tipice ale unei răceli moderate, dar pot duce și la infecții severe ale bolii, cum ar fi bronșita sau pneumonia și chiar moartea.

➤ Obiectivele programului/activității principale:

- identificarea virusurilor respiratorii prin rRT-PCR sau clasic PCR;
- procurarea tulpinilor de referință pentru a constitui stocuri care vor fi utile în calitate de controale pozitive în următoarele etape;
- procurarea și întreținerea liniilor celulare;
- multiplicarea virusurilor pe cultură celulară
- implementarea și optimizarea metodelor pentru identificarea tulpinilor de virus multiplicat în cultură celulară (de exemplu: hemaglutinoinhibare);
- optimizarea secvențierii clasice pentru analiza genelor de interes precum și implementarea secvențierii de nouă generație pentru analiza întregului genom;
- aprecierea corespondenței între identitatea tulpinilor de virus gripal circulante în sezon și tulpinile incluse în vaccinul gripal sezonier;
- stabilirea corelației între testele antigenice, fenotipice și genotipice la tulpinile circulante;
- întărirea capacității de supraveghere moleculară a virusurilor respiratorii, diferențierea genetică a virusului sălbatic de cel vaccinal, analize filogenetice;
- dezvoltarea metodelor de identificare a mutațiilor de rezistență la antivirale;
- optimizarea și implementarea unor metode real time RT-PCR utilizând sonde SNP pentru detectarea mutațiilor de rezistență la antivirale;
- dezvoltarea metodologiei de evaluare in vitro a presiunii selective a oseltamivir asupra emergenței tulpinilor rezistente;
- monitorizarea rezistenței la antivirale a virusurilor gripale umane;
- validarea tehnicilor folosite pentru elaborarea metodologiilor de testare pentru supravegherea cu laboratorul a infecțiilor respiratorii acute și severe;
- dezvoltarea și optimizarea metodelor pentru identificarea mecanismelor mutaționale specifice, responsabile pentru rezistența la antivirale a virusurilor gripale;
- analiza genetică a virusurilor respiratorii pentru identificarea mutațiilor de rezistență la antivirale;
- propuneri de algoritmi de testare a virusurilor gripale în elaborarea ghidurilor metodologice pentru supravegherea microbiologică a infecțiilor respiratorii virale;
- întărirea sistemului de supraveghere prin dezvoltarea tehnicilor de identificare a virusului rujeolei, rubeolei sau parotiditei epidemice în laborator;
- limitarea epidemiilor sau pandemiilor determinate de aceste virusuri;
- validarea testului de rRT-PCR pentru identificarea virusurilor gripale;
- multiplicarea virusurilor gripale pe cultură celulară (MDCK/MDCK-Siat-1);
- optimizarea metodelor moleculare de identificare a mutațiilor punctiforme din structura neuraminidazei tulpinilor de virus multiplicat în cultură celulară (SNP = Single Nucleotide Polymorphism);
- identificarea anticorpilor specifici prin utilizarea metodei clasice de laborator;
- optimizarea metodelor moleculare de identificare a virusurilor rujeolei, rubeolei sau parotiditei epidemice;
- validarea testelor de rRT-PCR pentru identificarea virusurilor rujeolei și rubeolei;
- testarea pentru a identifica prezența virusurilor rujeolei, rubeolei sau parotiditei epidemice pentru a putea permite detectarea întreruperii circulației virale indigene, unul dintre indicatorii de eliminare fiind verificarea absenței circulației endemice a virusului pentru cel puțin un an;
- dezvoltarea metodologiei pentru monitorizarea virusurilor rujeolei și rubeolei pentru a intra în etapele de eliminare și eradicare ale acestor infecții prevenibile prin vaccinare.

➤ Rezultate

Tulpinile de virus gripal tip A, subtip H1 și tip B, au fost caracterizate antigenic după multiplicarea în cultura celulară și izolare prin reacția clasică de inhibare a hemaglutininei. Tulpinile izolate de virus A/H1N1pdm09 au fost bine recunoscute de grupul de antiseruri, inclusiv antiserul



produs împotriva virusului A/Michigan /45/2015, cu unele excepții. Tulpinile de virus testate au fost slab recunoscute de antiserurile împotriva A/Lviv/N6/2009 și A/Elveția/2656/2011 la titruri de >4 ori mai mici decât titrul pentru virusul omolog. Trebuie remarcat faptul că antiserurile pentru A/Lviv/N6/2009 sunt adesea o combinație neobișnuită de virus/antiser, cu substituțiile de aminoacizi HA1 ale G155G/E, cu E predominant, și D222G. Caracterizarea antigenică a virusurilor A/H3N2 prin testul HI continuă să fie dificilă din cauza aglutinării variabile a celulelor roșii din sânge de la cobai, curcan și oameni. Unele tulpini izolate de virus gripal au fost slab recunoscute de antiserurile produse împotriva virusurilor de referință propagate pe ouă embrionate A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (subclada 3C.2a1), A/Switzerland/8060/2017 (subclada 3C. 2a2), A/Netherlands/10260/2018 (3C.2a1b) și A/Bretagne/1413/2017(3C.2a2). Tulpinile de virus gripal multiplicat și izolat de tip A, subtipul H3 pot fi detectate, dar nu pot fi identificate antigenic din cauza incapacității de a se lega de receptori specifici de pe eritrocite/globule roșii. Această situație este comună în rândul țărilor participante la sistemul de supraveghere a gripei și este întâlnită și în țara noastră. Este necesar să se introducă metode noi și optimizate pentru ca centrul de referință pentru gripă să își extindă capacitatea de identificare a tulpinilor circulante în România.

Secvențierea întregului genom a devenit un instrument important pentru înțelegerea transmiterii și epidemiologiei bolilor infecțioase. Monitorizarea „circulației” virusurilor gripale contribuie la depistarea precoce a noilor substituții de aminoacizi care ar putea influența patogenitatea, tropismul și capacitatea de transmitere de la o specie la alta; evidențierea factorilor determinanți ai reasortării virusurilor, în special în apariția unor noi virusuri cu potențial pandemic, inclusiv apariția unor tulpini de virusuri gripale rezistente la medicamentele antivirale aflate în uz (extrem de importantă pentru identificarea de noi medicamente antivirale cu efect antigripal). **Secvențele obținute sunt primele date privind întregul genom al SARS-CoV-2 din România.** Toate secvențele genomului virusurilor gripale și SARS-CoV-2 cu metadate asociate au fost încărcate în baza de date GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*), iar pentru virusurile rujeolei și rubeolei în MeaNS (*Measles Virus Nucleotide Surveillance*) și RubeNS (*Rubella Virus Nucleotide Surveillance*). Caracterizarea genetică a virusurilor gripale identificate poate crește înțelegerea factorilor genetici virali care pot duce la reducerea eficacității vaccinului antigripal. Metoda Sanger a fost utilă pentru efectuarea secvențierii parțiale, dar secvențierea de nouă generație (NGS) a fost mai potrivită pentru secvențierea întregului genom (WGS – *whole genome sequencing*) a virusului gripal sau SARS-CoV-2 izolat de la cazuri grave. Rezultatele WGS care devin rapid disponibile pot oferi o mai bună înțelegere a dinamicii evolutive și epidemiologice a virusului gripal și pot completa procedurile tradiționale de control al infecțiilor în investigarea și gestionarea focarelor de gripă. Răspândirea masivă a SARS-CoV-2 în populație a dus la acumularea de mutații în genomul viral. Mutațiile și alte modificări ale genomului fac parte din procesul evolutiv natural. Implicațiile mutațiilor, inserțiilor sau delețiilor în genomul SARS-CoV-2 sunt dificil de interpretat doar din analiza secvenței. S-a dovedit deja că virusul SARS-CoV-2 prezintă variabilitate genetică și a devenit endemic în populație. Observațiile epidemiologice combinate cu date experimentale sunt necesare pentru a evalua proprietățile virusului, cum ar fi infecțiozitatea, transmisibilitatea, tropismul, virulența, precum și studii suplimentare privind eficacitatea vaccinului.

#### ➤ Provocări

- odată cu numărul mare de secvențe obținute, apar provocări în analiza și interpretarea lor;
- una dintre provocările actuale este legată de apariția unor noi variante care uneori își schimbă zilnic „clasificarea”. Utilizarea unei nomenclaturi adecvate pentru datele obținute este o componentă majoră a supravegherii bazată pe obținerea secvenței agentului patogen care reflectă înrudirea genetică a secvențelor.

#### ➤ Concluzii

- Capacitatea de a efectua teste sigure și fiabile la scară largă este esențială pentru a detecta și a încetini progresia unei epidemii/pandemii;
- Se impune continuarea supravegherii moleculare, izolarea virală, caracterizarea antigenică, secvențierea întregului genom, testarea sensibilității la antivirale, pentru a înțelege schimbările evolutive semnificative și pentru a identifica viitoarele noi mutații care pot conferi rezistență la antivirale;
- Datele epidemiologice, diagnosticul de laborator și caracterizarea genetică permit și determinarea trasabilității rujeolei și rubeolei în România;

- Epidemiologia moleculară confirmă răspândirea virusului, fiind complementară epidemiologiei clasice. La fel de importantă este distincția dintre virusul sălbatic și virusul vaccin, folosind metode moleculare. Datorită programelor de supraveghere și imunizare, rujeola și rubeola au fost eliminate în mai multe țări. Întreruperea răspândirii endemice este un criteriu important pentru verificarea eliminării acestor virusuri în Europa. Încă există dificultăți în obținerea de probe biologice pentru diagnostic molecular (exsudat nazofaringian, urină), care să fie recoltate în același timp cu sângele, pentru diagnosticul serologic.

## **2.15. PN19140207 - Evaluarea microbiotei la cazurile PAF și contacti sănătoși – implicații în Strategia Globală de Eradicare a Poliomiozitei**

Identificarea patogenilor respiratori, intestinali, folosind sistemele de detecție moleculară în contextul pandemiei de SARS CoV -2. Corelații între profilurile patogenilor circulanți identificați la cazuri cu poliradiculonevrită și contacti sănătoși și cei identificați în probe de mediu în contextul pandemiei cu SARS CoV-2. Testarea folosind tehnica izolării pe culturi celulare a probelor de materii fecale și probelor de exsudat faringian recoltate de la cazuri cu poliradiculonevrită și contacti sănătoși.

În perioada 2019-2022 au fost investigate în Laboratorul infecțiilor enterice virale – laborator național de referință pentru poliovirus din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”, un număr de 131 probe de scaun și 53 probe de exsudat faringian recoltate de la cazurile PAF și contacti sănătoși. Produsele patologice au fost prelucrate conform protocolului standard OMS, pentru izolarea și caracterizarea enterovirusurilor. Pentru izolarea enterovirusurilor au fost utilizate cele două linii celulare: L20B (linia celulară de șoareci, modificată prin inginerie genetică, care exprimă receptorul pentru poliovirus uman) și linia RD (derivată din rhabdomyosarcom uman). Linia celulară RD, poate fi infectată de majoritatea enterovirusurilor, în timp ce linia celulară L20B este sensibilă numai pentru poliovirus. Toate produsele patologice au fost inoculate pe liniile celulare RD și L20B. Odată ce a fost obținut efectul citopatic complet (CPE), celulele infectate au fost recoltate și congelate la -200C.

Din cele 184 produse patologice, au fost izolate pe culturi celulare 25 de tulpini de enterovirus non polio (EVNP), restul au fost negative pentru enterovirusuri. Una dintre tulpini a fost identificată Cocksackie A 10.

În pandemia cu SARS CoV - 2 , am evaluat cocirculația EVNP cu alți patogeni în apele reziduale, cu scopul de a calcula prevalența și detecția introducerii sau dispariției din circulație a unor patogeni care la rândul lor pot fi responsabili de apariția unor focare epidemice (Băicuș A et al. Identification of SARS-CoV-2 and Enteroviruses in Sewage Water—A Pilot Study. *Viruses* 2021, 13, 844).

Folosind panelul Gastrointestinal Biofire Film array, au fost investigate 72 de probe de ape reziduale recoltate în anul 2020 din zone aflate la granița cu Ucraina. Apele reziduale au fost concentrate conform metodologiei OMS. Panelul respirator detectează 22 patogeni, *Campylobacter* (*jejuni*, *coli* & *upsaliensis*), *Clostridium difficile* (Toxin A/B), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* (*parahaemolyticus*, *vulnificus*, & *cholerae*) *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157, Enteropatogenic *E. coli* (EAEC), Enteropatogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/st*, Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2* *E. coli* O157 , *Shigella/Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Adenovirus F 40/41*, *Astrovirus*, *Norovirus GI/GII*, *Rotavirus A*, *Sapovirus (I,II,IV,V)*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

Evaluarea microbiotei faringiene și intestinale s-a făcut folosind sistemul RT-PCR , Biofire Film array, panourile respiratorii și digestive. Rezultatele au evidențiat coexistența tulpinilor de EVNP cu *H influenzae*, *Human parainfluenza*, *Sapovirus*, Tab. 1.

În absența prezenței EVNP s-a evidențiat în faringele copiilor investigați, prezența tulpinilor *Parainfluenza 3, 4*, *Human Rhinovirus/Enterovirus*, *Coronavirus OC43* , *Coronavirus 229*, *Adenovirus* și în intestin au fost identificate special: *EPEC*, *Norovirus GI/GII*, *Salmonella*, *Shigella/Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *EAEC Campylobacter*, *Adenovirus F40/41*.

Tab.1. Co existenta tulpinilor de EVNP cu alți patogeni la cazuri PAF și contacti sănătoși

	2018 Culturi celulare	2019 Culturi celulare	2020 Culturi celulare	2021 Culturi celulare	2022 Culturi celulare	Total
Probe de exsudat faringian/ pozitive EVNP	33/ 3 EVNP <sup>1</sup>			16/16 negative <sup>4.1.</sup>	4/4negativ <sup>5.1</sup>	53/3 EVNP
Probe de materii fecale/ pozitive EVNP	33/ 3 EVNP 30 negative	22/8EVNP <sup>2</sup> 14 negative	24/10EVNP <sup>3</sup> 14 negative	27/ 27negative <sup>4.2.</sup>	25/ 1EVNP/ 24negative <sup>5.2.</sup>	131/ 22 EVNP

EVNP – Enterovirus Non Polio

<sup>1</sup> 3 EVNP - H influenzae ( 3 tulpini)

<sup>2</sup> 8 EVNP - Human paraechovirus ( 5 tulpini), EPEC( 2 tulpini), Sapovirus ( o tulpina)

<sup>3</sup> 10 EVNP - Human rhinovirus (6 tulpini), Human Paraechovirus (o tulpina), Sapovirus (3 tulpini)

<sup>4.1.</sup> prezența tulpinilor microbiene patogene în faringele copiilor fara EVNP – 7 izolate pozitive - Parainfluenza 3 ( 2 tulpini), Parainfluenza 4 (o tulpina), Human Rhinovirus/Enterovirus (4 tulpini) Coronavirus OC43 (o tulpina) Coronavirus 229E (o tulpina)

<sup>4.2.</sup> prezența tulpinilor microbiene patogene în intestinul copiilor fără EVNP – 11 izolate pozitive - EPEC (3 tulpini), Norovirus GI/GII (6 tulpini), Salmonella (o tulpina), Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)(o tulpina).

<sup>5.1.</sup> prezența tulpinilor microbiene patogene în faringele copiilor fără EVNP- 1 izolat pozitiv – Adenovirus/ Rhinovirus/EV

<sup>5.2.</sup> prezenta tulpinilor microbiene patogene în intestinul copiilor fără EVNP - 7 izolate pozitive EPEC (2 tulpini), EAEC (2 tulpini), Campylobacter (o tulpina), Adenovirus F40/41 ( 2 tulpini)

S-a remarcat o prezență crescută a circulației tulpinilor de Rotavirus A, Adenovirus F40/41, Enteroagregative E. coli (EAEC), Campylobacter dar și prezența altor tulpini patogene, Tab 2.

Tab.2. Specii identificate în ape reziduale folosind panelul Gastrointestinal Biofire Film array

Microorganism	Număr de probe pozitive/ total probe	% probe pozitive
Adenovirus F 40/41	28/72	38%
Rotavirus A	33/72	45,8%
Astrovirus	3/72	4,1%
Norovirus GI/GII,	1/72	1,38%
Sapovirus (I,II,IV,V),	3/72	4,1%
Enteroagregative E. coli (EAEC)	27/72	37,5%
Enterotoxigenic E. coli (ETEC)	19/72	26,3%
Enteropathogenic E. coli (EPEC)	12/72	16,6%
Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)	10/72	13,8%
Shiga-like toxin-producing E. coli (STEC) stx1/stx2	15/72	20,83%
Yersinia enterocolitica	10/72	13,8%
Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus, & cholerae) Vibrio cholerae	3/72	4,1%
Campylobacter (jejuni, coli & upsaliensis),	25/72	34,7%

Au fost investigate în paralel 67 probe de apă reziduală și au fost izolate 22 tulpini de EVNP, unele identificate ca virus Coxsackie B. Folosind panelul Respirator 2.1 plus Biofire Film array, s-a remarcat o prezență crescută a circulației tulpinilor de Adenovirus, Rhinovirus /EV, SARS Cov-2, dar și prezența tulpinilor Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, Coronavirus OC43, Tab. 3.

Tab. 3. *Microorganisme identificate în ape reziduale folosind panelul Respirator 2.1 plus Biofire Film array*

	Judet/nr probe testate/ pozitive EVNP								Total probe testate/ pozitive EVNP	% probe pozitive
	MM 27/12	SM 10/0	SV 8/1	TL 10/6	CT 7/3	VS 1/0	IS 2/0	GLi 2/0	67/22 (32,8%)	
Adenovirus	26	5	3	10	6	1	1	2	54/67	80,5%
Rhinovirus /EV	24	4	3	9	4		1	2	47/67	70,14%
Parainfluenzaevirus 4	1								1/67	1,4%
Parainfluenzaevirus 3	2		1	2					5/67	7,4%
RSV			1						1/67	1,4%
SARS Cov-2	7	2	5	3	1				18/67	26,8%
Coronavirus 229E	2			1	1				4/67	5,9%
Coronavirus HKU1	1			1					2/67	2,9%
Coronavirus OC43	1								1/67	1,4%

Rezultatele acestui studiu privind coexistența la copii a enterovirusurilor cu patogenii respiratori și intestinali și care s-au identificat ulterior și în ape reziduale, confirmă importanța introducerii acestui tip de supraveghere combinată în strategia de limitare a circulației, transmiterii și emergenței tulpinilor modificate genetic în populația sănătoasă.

### 3. Prezentarea rezultatelor:

#### 3.1 Valorificarea în producție a rezultatelor obținute:

Denumirea proiectului	Tipul rezultatului	Efecte scontate
1.PN19140101 Cultivarea virusului rabic fix pe culturi celulare în vederea dezvoltării de vaccinuri bazate pe biotehnologii celulare de ultimă generație	Tehnologii pentru avansare în faza de validare CMC și pilot	1. Tehnologie de cultivare a virusului rabic fix Babeș/BAB-TMP pe culturi celulare și metode de identificare și cuantificare 2. Tehnologie de preparare a unui vaccin rabic inactivat pe substraturi celulare cu tulpina Babeș/BAB-TMP de virus rabic fix
2.PN19140102 Organizarea biobăncii de linii celulare și probe biologice umane ca structura de tip „core facility” pentru Institutul National de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”	Studii, documentații, articole și comunicări științifice	Realizarea studiilor de cercetare – dezvoltare biomedicală care utilizează probe biologice, în acord cu normele naționale și internaționale în vigoare. Oportunități de dezvoltare și colaborări în domeniul cercetării medicale.

<p>3.PN19140103 Modularea răspunsului imun de către factori endogeni/exogeni care activează receptorii imunității înăscute</p>	<p>(studiu proiect, prototip, tehnolog, etc., alte rezultate)</p>	<p>Studiu de optimizare a condițiilor de obținere a DC mature pulsate cu antigene bacteriene și lizate tumorale. Studiu de stimulare in vitro antigen-specifică a limfocitelor T cu peptid antigenic HA.</p>
<p>4.PN19140104 Dezvoltarea unor metode pentru caracterizarea complexă a răspunsului imun la nivel tisular</p>	<p>- metodă de punere în evidență a interacției dintre matrice MALDI și analit prin microscopie de fluorescență cuplată cu imagistică MALDI - studiu privind posibilitatea de detecție simultană prin MALDI-MS a mai multor compuși diferiți - studiu privind efectul acidului trifluoracetic asupra detecției MALDI-MS cu acid 2,5 – dihidroxibenzoic - metodă de separare a unui amestec de fosfolipide prin cromatografie în strat subțire și identificare prin cuplare cu spectrometria de masă MALDI - studiu privind posibilitatea de identificare a modificărilor fenotipice la nivel de proteom pe celule cultivate in vitro - studiu privind posibilitatea de identificare a modificărilor fenotipice la nivel de proteom pe țesut.</p>	<p>- s-au fost analizat fizico-chimic compuși folosiți ca matrice în spectrometria de masă MALDI. În particular, pentru acidul 2,5 – dihidroxibenzoic s-a putut pune în evidență prin microscopie de fluorescență existența polimorfismului de cristalizare și a putut fi corelat cu spectre de masă complet distincte. De asemenea, s-a observat, pentru toate matricile din studiu partiția discretă a semnalului de analit. - s-au testat detecția și dispunerea spațială a mai multor analiți în cristalele din amestec cu acidul 2,5 – dihidroxibenzoic. S-au putut analiza doi sau mai mulți analiți cocrystalizați. S-a testat influența unuia dintre cei mai comuni aditivi folosiți în MALDI-MS, acidul trifluoracetic; urmează testarea altor aditivi. S-a reușit separarea cromatografică pe strat subțire a unui amestec complex de fosfolipide într-un sistem de solvenți atent selecționat. Ulterior, s-a reușit analiza și identificarea analiților separați prin acoperire uniformă cu acid 2,5 – dihidroxibenzoic și analiză prin spectrometrie de masă MALDI. - s-a testat posibilitatea de a realiza achiziții de tip imagistică MALDI pe celule cultivate și de a observa deferențe care apar ca urmare a stimulării cu un imunomodulator clasic. În acest scop s-a folosit linia celulară de macrofage murine RAW264.7 pentru a simula reacția la stimularea cu lipopolizaharid. Același lucru s-a testat și pe criosecțiuni de țesut (plămân). Achiziția s-a realizat și în varianta de pre-tratare a probelor cu tripsina pentru a simula o abordare de tip bottom-up. S-au putut observa deferențe fenotipice între variantele testate și s-au selectat markeri pentru diferențiere.</p>

<p>5.PN19140105</p> <p>Metode de imagistică pentru evaluarea captării, traficului intracelular, procesării și prezentării antigenelor de către celulele dendritice în contextul utilizării diversilor adjuvanți</p>	<p>Studiu privind design-ul și clonare a proteinelor de fuziune activabile prin proteoliza cu situs de clivare pentru tripsina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Studiu privind testarea utilității unei proteine de fuziune fluorescente bazată pe EGFP ca sondă FRET.</li> <li>- Metodă de producere a unei sonde fluorescente prin marcarea a unei proteine cu un fluorofor reactiv.</li> <li>- Studiu privind modificarea semnalului FRET sub acțiunea proteolitică a tripsinei.</li> <li>- Studiu de optimizare a complexării proteinelor cu un adjuvant model.</li> <li>- Metodă optimizată de monitorizare a captării și procesării antigenelor de către celulele dendritice maturate.</li> <li>- Studiu de evaluare a activității proteolitice din lizate celulare prin monitorizarea modificării semnalului FRET în cupluri donor proteic/acceptor chimic.</li> <li>- Metodă evaluare prin microscopie de fluorescență de înaltă rezoluție și FRET a acumulării, internalizării și traficului intracelular al antigenelor în funcție de adjuvantul folosit.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proiectarea unei unei proteine de fuziune cu proprietăți de fluorescență modificabile prin proteoliză ce poate fi utilizată pentru monitorizarea procesării antigenelor intracelular.</li> <li>Proteina testată poate fi folosită ca sonda FRET pentru determinarea activității proteolitice.</li> <li>-Condiții optimizate pentru cuplarea eficienței a fluorocromilor chimici pe proteine fluorescente pentru a modifica spectrul de fluorescență.</li> <li>-Permite monitorizarea activității proteolitice prin modificarea semnalului FRET.</li> <li>-Stabilirea condițiilor de legare și metodelor de testare a complexității proteinelor cu un adjuvant model.</li> <li>-Metodă optimizată ce permite monitorizarea captării și procesării antigenelor de către celulele dendritice maturate în dinamică, prin microscopie în condiții fiziologice.</li> <li>-Permite evaluarea globală a activității proteolitice din lizate celulare prin monitorizarea modificării semnalului FRET în cupluri donor proteic/acceptor chimic.</li> <li>-Metodologie optimizată ce permite evaluarea prin microscopie de fluorescență de înaltă rezoluție și FRET a acumulării, internalizării și traficului intracelular al antigenelor în funcție de adjuvantul folosit</li> </ul>
<p>6. PN19140106</p> <p>Studii pentru evaluarea efectului imunomodulator și hepatoprotector al unor suplimente alimentare (SOD natural) asupra unor disfuncții metabolice</p>	<p>Tehnologie</p>	<p>Rețete de fabricație diete purificate.</p> <p>Modele de animale cu sindroame metabolice induse.</p>

<p>7.PN19140108 Caracterizare a complexelor proteice prin metode cromatografice și proteomice avansate în scopul identificării relației structură funcție în răspunsul imun.</p>	<p>Metodologie</p>	<p>Analiza complexelor antigen-ajuvant în vederea caracterizării și a evaluării stabilității lor în timp, în diferite condiții.</p>
<p>8.PN19140203 Dezvoltarea metodelor utilizate pentru diagnosticul tusei convulsive în scopul evaluării riscului apariției unei epidemii, ca rezultat al lipsei imunizării specifice.</p>	<p>Studiu proiect: -optimizarea metodelor de determinare a titrului anticorpilor de tip IgG și IgA; -optimizarea metodelor moleculare de diagnostic și caracterizare a <i>B. pertussis</i>; - dezvoltarea unei metode de expresie antigenică la <i>Bordetella pertussis</i>.</p>	<p>-Îmbunătățirea stării de sănătate a populației, prin aplicarea unei metode adecvate de diagnostic al tusei convulsive; -Limitarea circulației tulpinilor virulente, prin identificarea mai rapidă a acestora; Reducerea costurilor de diagnostic și a timpului de confirmare/infirmare a diagnosticului.</p>
<p>9.PN19140204: Dezvoltarea unor metode avansate pentru detecția, identificarea și caracterizarea patogenilor emergenți, cu aplicabilitate în sănătatea publică și biosecuritate</p>	<p>- Metode de biologie moleculară pentru detecția rapidă și identificarea principalelor genuri de virusuri transmise de artropode din familia Flaviviridae și Ordinul Bunyavirales; - Metoda de caracterizare moleculară a genotipurilor de <i>L. pneumophila</i> care circulă în România; - Optimizarea unor metode de biologie moleculară pentru detecția și identificarea bazată pe secvențiere a unor flavivirusuri și bunyavirusuri de importanță pentru sănătatea publică. - Metoda de identificare rapidă a izolatelor de Legionella la nivel de specie prin MALDI-TOF MS. - Metode de biologie moleculară (bazate pe tehnicile real-time RT-PCR și real-time PCR) pentru detecția rapidă și identificarea principalelor specii de virusuri</p>	<p>- Am dezvoltat metodele bazate pe utilizarea tehnicilor RT-PCR și real-time-RT-PCR cu primeri și sonde moleculare cu specificitate pentru principalele genuri de virusuri transmise de artropode de interes pentru sănătatea publică: flavivirusuri și bunyavirusuri.  - Am introdus metoda de tipizare moleculară SBT – sequence based typing pentru caracterizarea genotipurilor de Legionella pneumophila, care sunt prezente în rândul izolatelor de mediu din România. Cunoașterea genotipurilor de <i>L. pneumophila</i> circulante în țara noastră va fi utilă în trasarea sursei de infecție, a cărei recunoaștere este importantă pentru implementarea măsurilor de prevenire și control. - Au fost dezvoltate două metode de identificare, bazate pe teste RT-PCR cuplate cu secvențierea pentru detecția agenților patogeni transmiși de artropode din familia Flaviviridae și ordinul Bunyavirales. - A fost dezvoltată o metodă care va permite identificarea rapidă a coloniilor de Legionella dezvoltate pe medii de cultură în urma cultivării din probe de apă sau din probe clinice - Au fost dezvoltate două metode pentru detecția și identificarea genomului de alphavirus și respectiv de orthopoxvirus</p>

	<p>transmise de artropode din genurile Alphavirus și Orthopoxvirus.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validarea metodei de identificare rapidă a speciilor de Legionella bazată pe spectrometria de masă MALDI-TOF.</li> <li>- Metoda de secvențiere a întregului genom (WGS) pentru caracterizarea izolatelor din clinică și de mediu de Legionella pneumophila în cadrul anchetelor epidemiologice pentru stabilirea sursei de infecție</li> </ul>	<p>pe care îl suspectăm pe baza datelor clinice și epidemiologice ale cazului suspect de infecție cu un arbovirus cunoscut sau nou, emergent.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A fost validată metoda fenotipică bazată pe spectrometria de masă tip MALDI-TOF pentru identificarea speciilor genului Legionella în rândul izolatelor de mediu sau clinice de Legionella, care va fi utilizată în practica curentă a laboratorului.</li> <li>- A fost introdusă o metodă de caracterizare a diversității genetice a izolatelor de Legionella din probe clinice și de mediu, bazată pe secvențierea de nouă generație a întregului genom, care va putea fi utilizată în anchetele epidemiologice pentru trasarea sursei de infecție în cazurile/clusterele/focarele de legioneloză.</li> </ul>
<p>10.PN19140205 Modele avansate pentru evaluarea formării și comportamentului dinamic al biofilmelor bacteriene, în prezența și absența substanțelor antimicrobiene comportamentului dinamic al biofilmelor bacteriene, în prezența și absența substanțelor antimicrobiene</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metode de dezvoltare și detecție biofilme bacteriene.</li> <li>- Metode de biologie moleculară (reacții PCR) pentru detectarea genelor implicate în formarea biofilmului bacterian, în virulență și în rezistența la antibiotice, reacții necesare caracterizării complexe a tulpinilor bacteriene.</li> <li>- Metoda de secvențiere a întregului genom (WGS) pentru caracterizarea izolatelor clinice de Staphylococcus aureus în cadrul anchetelor epidemiologice pentru stabilirea sursei de infecție.</li> <li>- Realizarea unei colecții de tulpini bacteriene Gram pozitive și negative în cadrul laboratorului INRA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Au fost dezvoltate metode de detecție a biofilmelor bacteriene</li> <li>- A fost introdusă o metodă de caracterizare a diversității genetice a izolatelor clinice de Staphylococcus aureus, bazată pe secvențierea de nouă generație a întregului genom, care va putea fi utilizată în anchetele epidemiologice pentru trasarea sursei de infecție în cazurile/clusterele/focarele cu Staphylococcus aureus.</li> <li>- Au fost dezvoltate metode de biologie moleculară (reacții PCR) pentru detectarea genelor implicate în formarea biofilmului bacterian, în virulență și în rezistența la antibiotice.</li> <li>- S-a realizat colecția de tulpini bacteriene Gram pozitive și negative în cadrul laboratorului INRA.</li> </ul>
<p>11.PN19140207 Evaluarea microbiotei la cazurile cu paralizie acută flască (PAF) și contacti sănătoși - implicații în Strategia Globală de Eradicare a Poliomielitei</p>	<p>Articol</p>	<p>Obiectivele fazelor – îndeplinite Rezultatele acestui studiu privind coexistența la copii a enterovirusurilor cu patogenii respiratori și intestinali și care s-au identificat ulterior și în ape reziduale, confirmă importanța introducerii acestui tip de supraveghere combinată în strategia de limitare a</p>



		<p>circulației, transmiterii și emergenței tulpinilor modificate genetic în populația sănătoasă.</p> <p>Deoarece virusurile Cocksackie A și B, pe care le-am identificat în studiul nostru, pot declanșa diferite manifestări clinice, infecții respiratorii, meningită, miocardită, obiectivul nostru următor este de a găsi terapii alternative în prevenția, tratarea infecțiilor cu enterovirusuri, folosind extracte pe bază de carvacrol, timol dar și diferite formulări ale uleiurilor esențiale de oregano, scorțișoară și cimbru, încapsulate în sisteme de nanocapsule/nanoparticule sau nanopurtători pe bază de lipide care pot scădea volatilitatea acestora, îmbunătățind stabilitatea chimică a acestora, crescând solubilitatea în apă, biodisponibilitatea și eficacitatea antivirală astfel încât să poată fi utilizate în terapie.</p>
--	--	--

### **3.2. Documentații, studii, lucrări, planuri, scheme și altele asemenea:**

<b>Tip</b>	<b>Nr. Total</b>	<b>în 2019</b>	<b>în 2020</b>	<b>în 2021</b>	<b>în 2022</b>
Documentații	28	4	8	5	11
Studii	39	8	8	11	12
Lucrări	23	4	2	5	12
Planuri	0	0	0	0	0
Scheme	5	2	1	2	0
Altele asemenea ( <i>se vor specifica</i> )	5	2	2	1	0
Proceduri operaționale specifice și instrucțiuni de lucru	5	2	2	1	0

**Din care:****3.2.1. Lucrări științifice publicate în jurnale cu factor de impact relativ ne-nul (2019-2022):**

Nr.	Titlul articolului	Numele Jurnalului, Volumul, pagina nr.	Nume Autor	Anul publicării	Scorul relativ de influență al articolului	Nr. de citări ISI
1.	Characterization and host-feeding patterns of <i>Culex pipiens</i> s.l. taxa in an endemic West Nile virus area in southeastern Romania.	Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 21(9).	Tiron G. V., Stancu I. G., Dinu S., Prioteasa F. L., Fălcută E., Ceianu C.S., Cotar A.I.	2021	2,133	
2.	A Snapshot of the Genetic Diversity of <i>Salmonella</i> Enteritidis Population Involved in Human Infections in Romania Taken in the European Epidemiological Context	Pathogens, 2021 Nov; 10(11): 1490. doi: 10.3390/pathogens10111490	Usein, C.-R.; Oprea, M.; Ciontea, A.S.; Dinu, S.; Cristea, D.; Zota, L.C.; Kotila, S. A	2021		1
3.	Characterization and host-feeding patterns of <i>Culex pipiens</i> s.l. taxa in an endemic West Nile virus area in southeastern Romania.	Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2021, 21(9). doi:10.1089/vbz.2020.2739.	Tiron G. V., Stancu I. G., Dinu S., Prioteasa F. L., Fălcută E., Ceianu C.S., <b>Cotar A.I.</b>	2021	2,133	4
4.	Identification of SARS-CoV-2 and Enteroviruses in Sewage Water — A Pilot Study.	Viruses, 13, 844. <a href="https://doi.org/10.3390/v13050844">https://doi.org/10.3390/v13050844</a>	Băicuș A et al.	2021	FI : 5,818	1
5.	Using Rapid Analyte Measurement Platform (RAMP) as a Tool for an Early Warning System Assessing West Nile Virus Epidemiological Risk in Bucharest, Romania.	Tropical Medicine and Infectious Diseases, 2022, 7, 327.	Prioteasa, F.L.; Tiron, G.V.; Dinu, S.; Fălcută, E.	2022	3,711	

6.	Distribution of Insecticide Resistance Genetic Markers in the West Nile Virus Vector <i>Culex pipiens</i> from South-Eastern Romania.	Insects, 2022, 13,1062.	Stancu, I.G.; Prioteasa, F.L.; Tiron, G.V.; Cotar, A.I.; Fălcută, E.; Porea, D.; Dinu, S.; Ceianu, C.S.; Csutak, O.	2022	3,141	
7.	An insight into the fecal microbiota composition in Romanian patients with ankylosing spondylitis using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing.	Rev Romana Med Lab. 29(1):49-61. DOI:10.2478/rrlm-2022-0004	Oprea M, Cristea D, Dinu S, Ciontea SA, Bojinca VC, Predeteanu D, et al	2022		
8.	Distribution of Insecticide Resistance Genetic Markers in the West Nile Virus Vector <i>Culex pipiens</i> from South-Eastern Romania	Insects 2022, 13, 1062. <a href="https://doi.org/10.3390/insects13111062">https://doi.org/10.3390/insects13111062</a>	Stancu I.G.; Prioteasa F.L.; Tiron G.V.; Cotar A.I.; Fălcută E.; Porea D.; Dinu S.; Ceianu, C.S.; Csutak, O.	2022	3,141	

**3.2.2. Lucrări/comunicări științifice publicate la manifestări științifice (conferințe, seminarii, workshops, etc):**

Nr. crt.	Titlul articolului, Manifestarea științifică, Volumul, Pagina nr.	Nume Autor	An apariție	Nr. citări ISI
1.	Profilul produsului țintă ( <i>TPP – target product profile</i> ) ca instrument central de planificare pentru cercetarea biofarmaceutică: aplicare pentru dezvoltarea unui nou vaccin antirabic de uz uman. Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” București, 25 noiembrie 2019	Tănasă RI, Podgoreanu P Marandiuc IM,	2019	
2.	Biobanca – modă sau necesitate?, Sesiunea Științifică a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	AR Lupu, AM Nășcuțiu	2019	
3.	Biobanca – structură de tip „core facility” in cadrul I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, prelegere pentru studenții de la Masterul de Infrastructuri critice (UNAp)	Andreea Roxana Lupu	2019	
4.	Poster: „Sistem de Avertizare în Timp Real al Riscului Epidemiologic Arboviral pentru Zona București”, Revista Bacteriologia Virusologia Parazitologia Epidemiologia, vol. 64, iulie-decembrie 3-4/2019. A XII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie 14-16 noiembrie	Prioteasa Florian-Liviu, Stancu Ioana Georgiana, Tiron Georgiana Victorița, Dinu Sorin, Ceianu Cornelia Svetlana, Fălcută Elena	2019	

5.	Comunicarea orală A two-year comparative survey (2015 – 2016) of West Nile virus circulation in Sălchioara-Jurilovca area” Deltas and Wetlands (Book of Abstract), vol. 6, Tulcea – 2019, Pagina nr. 25	E. Fălcută, M. Marinov, A. Cotar, S. Dinu, A. Doroșencu, V. Alexe, C. Ceianu, A. Vladimirescu, V. Purcărea – Ciulacu, L. Prioteasa	2019	
6.	Poster The West Nile Virus molecular detection in vectors: from the benchtop to the field - deployable laboratory” Deltas and Wetlands (Book of Abstract), vol. 6, Tulcea – 2019, Pagina nr. 30	Alexandru Filip Vladimirescu, Valeria Ciulacu-Purcărea, Liviu Florian Priotesa, Elena Fălcută	2019	
7.	Diversitatea genetică a izolatelor umane de <i>Campylobacter jejuni</i> , Conferința de Microbiologie și Epidemiologie. Bacteriologia. Virusologia. Parazitologia. Epidemiologia 2019	Mădălina Cornelia Militaru, Codruța Romanița Usein, Marilena Sorokin, Simona Ciontea, Daniela Cristea, Ileana Stoica	2019	
8.	<i>Bordetella pertussis</i> adherence to and invasion of HeLa-229 and Hep-2 eukaryotic cells; Conferința internațională EUPertstrain/EUPertgenomics 2019, Roma, Conference Abstract Book, pg. 24	Georgeta Cristina Oprea, Alina Maria Holban, Mariana Carmen Chifiriuc, Carmen Curuțiu, Pană Marina, Veronica Lazăr	2019	
9.	Optimization and validation of diagnostic methods of yellow fever in reference laboratory for vector-borne infections from Cantacuzino National Medico-Military Institute for Research and Development. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Vol.78 -Issue 4, October-December 2019:222-223	Cotar AI, Florescu SA, Popescu CP, Bădescu D, Ceianu CS.	2019	
10.	Multiplication of measles virus that circulated in Romania during 2017-2019 using Vero/h SLAM cellular substrate - The ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE of the ROMANIAN SOCIETY of BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY Iași, 26-27 septembrie	Cherciu Carmen	2019	
11.	Două cazuri fatale asociate infecției cu Virus Respirator Sincizial la adulți, A XII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie Microbiologia și Epidemiologia Românească, 14-16 noiembrie	Mihai Maria Elena	2019	
12.	Surveillance of susceptibility to oseltamivir of circulating influenza viruses 2018/2019, Conferința Internațională de Microbiologie, Imunologie și Imunoterapie (International Conference on Microbiology Immunology and Immunotherapy), Barcelona, Spania, 4-5.11.2019 Journal of Clinical Immunology and Immunotherapy, ISSN:2378-8844, Volum 5, pag. 33	Mihai Maria Elena	2019	

13.	Caracterizarea antigenică a izolatelor de virus gripal în perioada 2015-2019 în România. A XII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie Microbiologia și Epidemiologia Românească, 14-16 noiembrie	Cherciu Carmen	2019	
14.	Evaluarea markerilor de diagnostic pentru infecția cu virusul rujeolos în contextul unei epidemii în România, a 48-a Conferință Anuală de Imunologie cu participare internațională, Asociația Română de Imuno-Dermatologie, Societatea de Imunologie din România, 18-21 septembrie	Pascu Cătălina	2019	
15.	Rolul laboratorului în diagnosticul infecțiilor respiratorii virale, Simpozionul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară Cantacuzino, 25 noiembrie	Cherciu Carmen	2019	
16.	Optimizarea condițiilor pentru dezvoltarea și detectarea biofilmelor bacteriene într-un sistem închis: dispozitivul Calgary, A XII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie cu participare internațională, 14-16 noiembrie 2019, București, iar rezumatul este publicat în revista Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, 2019, 64(3-4): 123-125 (poster).	Elena-Carmina Drăgulescu, Brîndușa-Elena Lixandru, Cătălin Țucureanu, Irina Codiță	2019	
17.	Izolarea virusului rabic fix - tulpina Babeș – pe culturi celulare în scop biotehnologic. Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” București, 25 noiembrie 2020. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, vol. 79 – Supplement 1, pag. 107-108	Tănasă RI, Marandiu IM, Podgoreanu P, Vlase E, Coman C	2020	
18.	What do we owe to Henrietta Lacks? Considerations on the Ethics of Biobanking., Nascutiu A.M., Lupu A.R.	Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Vol 79(1): 54-67	2020	
19.	Disponere spațială preferențială a analiților în amestecurile cu matricile folosite în spectrometria de masă MALDI, Sesiunea științifică a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Tofan Vlad-Constantin, Țucureanu Cătălin	2020	
20.	Rezultate preliminare în prevenirea sindromului metabolic al obezității prin administrarea suplimentului alimentar SOD Natural la un model murin, Sesiunea anuală științifică a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, Volumul de rezumate, pg 6	Diana – Larisa Ancuța, Fabiola Ioniță, Petronica Gheorghiu, Vladimir Suhăianu, Cristin Coman	2020	
21.	Poster: Caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus West Nile din România în perioada 2018-2020. Revista Bacteriologia Virusologia Parazitologia	Georgiana V. Tiron, Ioana G. Stancu, Cornelia S. Ceianu, Elena Falcuță, Daniela Badescu, Liviu F.	2020	

	Epidemiologia, vol../2020. Sesiunea științifică a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Prioteasa, Ortansa Csutak, Ani I. Cotar		
22.	Dezvoltarea și implementarea unui sistem de avertizare timpurie asupra riscului epidemiologic arboviral în orașul București Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, 26 noiembrie 2020, București	Liviu Prioteasa, Georgiana Tiron, Ioana Stancu, Aurelian Pintiliescu, Valeria Ciulacu, Elena Fălcută	2020	
23.	Diversitatea tulpinilor de <i>Salmonella</i> Enteritidis rezistente la fluorochinolone în salmonelozele umane raportate în România - Conferința de Microbiologie și Epidemiologie 2020 – rezumat publicat în Bacteriologia. Virusologia. Parazitologia. Epidemiologia – pag. 37-39	Codruța-Romanița Usein, Adriana Simona Ciontea, Mihaela Oprea, Ramona Iordache, Maria Condei, Andrei Popa, Daniela Cristea, Lavinia Cipriana Zota	2020	
24.	Utilizarea unei alternative moleculare pentru serotipizarea tulpinilor de <i>Shigella flexneri</i> - Conferința de Microbiologie și Epidemiologie 2020 – rezumat publicat în Bacteriologia. Virusologia. Parazitologia. Epidemiologia – pag. 102-103	Cristea Daniela, Ciontea Adriana Simona, Oprea Mihaela <sup>1</sup> , Militaru Mădălina, Lavinia Zota, Andrei Melania Mihaela, Popa Andrei, Zamfir Mădălina, Usein Codruța-Romanița	2020	
25.	Microbiota fecală a pacienților cu spondilită anchilozantă - Sesiunea Științifică Anuală a INCDMM Cantacuzino 2020 – rezumat publicat in Romanian Archives of Microbiology and Immunology. 2020 Dec; 79(Supplemental 1):115-116.	Daniela Cristea, Denisa Predățeanu, Violeta Claudia Bojincă, Marius Trandafir, Sorin Dinu, Adriana Simona Ciontea, Codruța-Romanița Usein, Mihaela Oprea și colectivele laboratoarelor Epidemiologie Moleculară și Infecții Enterice Bacteriene	2020	
26.	Identification of <i>Bordetella sp.</i> DNA directly from the pathological samples using a rapid diagnostic kit; Conferința internațională EUPertstrain/EUPertgenomics 2020 (online), Paris; Conference Abstract Book	Georgeta Cristina Oprea, Ioana Sabina Macovei, Anamaria Ilie, Pană Marina	2020	
27.	Caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus West Nile (WNV) din România în perioada 2018-2020. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Vol.79 - Supplement 1, December 2020:116-117	Tiron GV, Stancu IG, Ceianu CS, Falcută E, Bădescu D, Prioteasa LF, Csutak O, Cotar AI.	2020	
28.	Identificarea virusurilor gripale circulante în sezonul 2019/2020 în România, aspect de laborator, Conferința Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 28-31 octombrie	Mihai Maria Elena	2020	
29.	Caracterizarea circulației virusurilor respiratorii în sezonul 2019/2020, realizată în laboratorul Infecții Respiratorii Virale, Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, 26 noiembrie	Cherciu Carmen	2020	

30.	Profiluri de rezistență și tipuri <i>spa</i> la tulpini de <i>Staphylococcus aureus</i> izolate din infecții de plagă în 2019/2020, A XIII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie Iași_online, 29-31 octombrie 2020, iar rezumatul este publicat în revista Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, 2020, 65(3-4): 71-74 (poster)	Drăgulescu Elena-Carmina, Negrea Ștefania-Mădălina, Buzea Mariana, Cașotă Cristiana, Filipov Marilena, Nistor Irina, Caliga Daniela, Crăciun Dorina, Indreas Marina, Codiță Irina	2020	
31.	Diversitatea genetică și rezistența la antibiotice a unor tulpini de <i>Staphylococcus aureus</i> izolate în 2019/2020 în 3 spitale din România, Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, 25 noiembrie 2020, iar rezumatul este publicat în revista Romanian Archives of Microbiology and Immunology, 2020, 79(Supplement 1): 117 - 119 (poster)	Drăgulescu Elena-Carmina, Negrea Ștefania-Mădălina, Buzea Mariana, Cașotă Cristiana, Filipov Marilena, Nistor Irina, Caliga Daniela, Crăciun Dorina, Indreas Marina, Codiță Irina	2020	
32.	Evaluarea patogenității tulpinii Babeș de virus rabic fix, adaptată pe culturi celulare, <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> . Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”. București, 25-27 noiembrie 2021	Tănasă RI, Marandiu IM, Podgoreanu P, Vlase E, Gal C	2021	
33.	Fondul genetic al izolatelor de <i>Escherichia coli</i> producătoare de toxină Shiga LEE-negative	Mihaela Oprea, Sorin Dinu, Adriana Simona Ciontea, Mădălina Militaru, Daniela Cristea, Codruța-Romanița Usein	2021	
34.	Analiza genomică a unor izolate de <i>Shigella sonnei</i> multirezistente la antibiotic	Daniela Cristea, Mihaela Oprea, Adriana Simona Ciontea, Sorin Dinu, Mădălina Militaru, Melania Mihaela Andrei, Andrei Popa, Mădălina Zamfir, Codruța-Romanița Usein	2021	
35.	Analiza secvenței întregului genom pentru caracterizarea norovirus GII.P17-GII.17 care a produs o epidemie de gastroenterită în județul Brașov, 2021	Sorin Dinu, Mihaela Oprea, Ramona-Ionela Iordache, Gabriela Oprișan, Codruța-Romanița Usein	2021	
36.	“Determination of IgG and IgA antibody titers against <i>Bordetella pertussis</i> virulence factors”, Conferința internațională EUPertstrain/EUPertgenomics, Slovenia; Conference Abstract Book 2021, pg.15	Georgeta Cristina Oprea	2021	
37.	„Tusea convulsivă – o boală prevenibilă prin vaccinare”; Simpozionul omagial „Institutul Cantacuzino – 100 de ani în slujba sănătății”	Georgeta Cristina Oprea, Cerasella Dragomirescu, Anamaria Ilie, Alexandrina Manea, Marina Pană	2021	
38.	Tulpinile de virus West Nile din linia genetică 2 circulante în România Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Vol. 80-Supplement, December 2021	Cotar A.I, Dinu S, Fălcută E, Tiron G.V, Prioteasa L.F, Bădescu D	2021	

39.	Rolul testării în supravegherea și controlul infecțiilor respiratorii virale, Webinar Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale Dr. Victor Babeș, 8-9 aprilie	Lazăr Mihaela	2021	
40.	Studiu privind variantele SARS-CoV-2 identificate în România, a XIV-a Conferința Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 4-6 noiembrie	Lazăr Mihaela	2021	
41.	Detectarea și caracterizarea genetică a virusului SARS-COV-2 - aspecte de laborator, Sesiunea Științifică a Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”, 25-27 noiembrie	Mihai Maria Elena	2021	
42.	Coexistența enterovirusurilor cu patogeni respiratori și digestivi la cazurile cu paralizie acută flască și contacti sănătoși. Studiu retrospectiv. Sesiunea I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, 25 noiembrie	Băicuș A & al.	2021	
43.	Secvențierea întregului genom al tulpinilor de <i>Staphylococcus aureus</i> MDR ca instrument de detectare a mecanismelor de rezistență și virulență, A XIV-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie București online, 04-06 noiembrie 2021, iar rezumatul este publicat în broșura evenimentului (poster)	Elena-Carmena Drăgulescu, Mihaela Oprea, Sorin Dinu, Mariana Buzea, Cristiana Cașotă, Marilena Filipov, Irina Nistor, Daniela Caliga, Dorina Crăciun, Marina Indreaș, Irina Codiță	2021	
44.	Teste <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i> pentru evaluarea potenței vaccinului rabic de uz uman. Conferința Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” București, 23-25 noiembrie 2022. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, vol. 81 – Special issue nov. 2022, pag. 75-76	Tănasă RI, Marandiu IM, Vlase E, Podgoreanu P, Petre A	2022	
45.	Merită animalele considerația noastră morală? Simpozion Bioetica în experimentarea pe animale	Coman Cristin	2022	
46.	De la șoarece la om. Simpozion Bioetica în experimentarea pe animale	Ana Maria Nășcuțiu	2022	
47.	Cercetarea translațională și gradul de credibilitate al rezultatelor obținute în studiile pe animale. Simpozion Bioetica în experimentarea pe animale	Diana Larisa Ancuța	2022	
48.	Studiile pe animale – un sacrificiu absolut necesar pentru cercetarea biomedicală? Simpozion Bioetica în experimentarea pe animale	Andreea Roxana Lupu	2022	



49.	Elastin-like polypeptide. Applications in recombinant protein based vaccine development, Conferința anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”2022	Tofan Vlad-Constantin, Țucureanu Cătălin, Tălpău Mădălina, Stăvaru Crina-Georgeta	2022	
50.	Elastin-like polypeptide. Applications in recombinant protein based vaccine development, Conferința anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Tofan Vlad-Constantin, Țucureanu Cătălin, Tălpău Mădălina, Stăvaru Crina-Georgeta	2022	
51.	Evaluarea inducerii sindromului de ateroscleroză la șobolani prin administrarea dietelor purificate, Sesiunea anuală științifică a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Volume 81, Special Issue , pg 69, November 2022	Ioniță Fabiola, Ancuța Diana, Gheorghiu Petronica, Coman Cristin	2022	
52.	Veziicule nanostructurate de interes vaccinal, Conferința științifică anuală a Institutului Cantacuzino „Progrese în cercetarea biomedicală de interes strategic” 23-25 noiembrie 2022	Dumitrașcu Andrei Mihai, Costache Adriana Zoe, Țucureanu Cătălin, Ermeneanu Andreea Laura, Tofan Vlad Constantin	2022	
53.	Following STEC in the WGS era. Scientific Session of the Cantacuzino National Military Medical Institute for Research and Development, 23-25 noiembrie 2022, Bucuresti. Roum Arch Microbiol Immunol.2022, Nov; 81(Special Issue):10-11.	Oprea M, Dinu S, Cristea D, Militaru MC, Popa LI, Iordache RI, Condei M, Andrei MM, Zamfir M, Popa A, Usein CR.-	2022	
54.	Genomic characterization of clinical isolates of <i>Campylobacter jejuni</i> ST824. Scientific Session of the Cantacuzino National Military Medical Institute for Research and Development, 23-25 noiembrie 2022, Bucuresti. Roum Arch Microbiol Immunol. 2022, Nov; 81(Special Issue):11-12.	Militaru CM, Popa LI, Oprea M, Cristea D, Sorokin M, Usein CR, Stoica I.	2022	
55.	“Molecular identification of <i>Bordetella pertussis</i> and expression of antigens”, Cel de-al 13-lea Simpozion Internațional <i>Bordetella</i> 2022; <a href="https://event.fourwaves.com/bordetella2022/pages">https://event.fourwaves.com/bordetella2022/pages</a>	Georgeta Cristina Oprea, Ilie Anamaria, Alexandrina Manea, Cerasella Dragomirescu, Marina Pană	2022	
56.	„Identification of anti- <i>Bordetella pertussis</i> specific antibodies in patients’ sera”, Conferința Internațională EUPertstrain/EUPertgenomics 2022	Georgeta Cristina Oprea, Ilie Anamaria, Alexandrina Manea, Cerasella Dragomirescu, Marina Pană	2022	
57.	Studiu pilot de secvențiere a întregului genom pentru caracterizarea izolatelor de <i>Legionella pneumophila</i> de mediu din România. Microbiology and Immunology, Vol. 81 - Special Issue, November	Cotar A.I, Oprea M, Tiron G.V, Dinu S, Popa L.I, Karpathakis I.I, Usein C.R, Bădescu D.	2022	
58.	Primele date de secvență genomică a virusului monkeypox din România. Microbiology and Immunology,	Dinu S, Oprea M, Tiron G V, Popa L I, Karpathakis I I, Usein C R, Bădescu D,	2022	

	Vol. 81 - Special Issue November 2022	Cotar A I		
59.	Screening molecular al unor tulpini de Legionella pneumophila izolate din mediu privind virulența. A XV-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 3-5.11.2022. Rezumat p.88-89	Tiron G.V, Bădescu D, Cotar A.I.	2022	
60.	Rolul laboratorului în supravegherea virusurilor gripale, a XV-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 3-5 noiembrie	Ivanciuc Alina	2022	
61.	Impactul pandemiei de COVID-19 asupra circulației altor infecții respiratorii virale în Români, a XV-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 3-5 noiembrie	Mihai Maria Elena	2022	
62.	Diagnosticul Infecțiilor Respiratorii – aspecte de laborator, Conferința anuală a Institutului Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară Cantacuzino, 23-25 noiembrie	Pascu Cătălina	2022	
63.	Supravegherea circulației tulpinilor de enterovirus în probe de mediu – metode de diagnostic. A X-a Conferința CMR, 27-30 aprilie 2022	Băicuș A	2022	
64.	View from Romania: when you need to introduce environmental surveillance. European Non-Polio Enterovirus Network (ENPEN) – simpozion on-line 20.10.2022	Băicuș A	2022 (în curs de publicare)	

### **3.2.3. Lucrări publicate în alte publicații relevante:**

<b>Nr.</b>	<b>Titlul articolului</b>	<b>Numele Jurnalului, Volumul, Pagina nr.</b>	<b>Nume Autor</b>	<b>Anul publicării</b>
1.	Analysis of blood parameters in a study of metabolic syndromes induction by purified diets in mice	Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Volume 79, Issue 1, pp 5-23, January-March 2020	Simona Popoiu, Ana-Maria Teodoru, Nicolae Levandovschi, Cristin Coman	2020
2.	Evaluation of induced metabolic syndrome of obesity by administering a purified diet in mice	Scientific Works. C Series. Veterinary Medicine, vol. LXVII (1): 161 - 167, 2021	Fabiola Ioniță, Diana Ancuța, Cristin Coman, Mario Darius Codreanu	2021
3.	Caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus West Nile (WNV) din România în perioada 2018-2020.	Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Vol.79 - Supplement 1, December 2020:116-117	Tiron GV, Stancu IG, Ceianu CS, Falcuță E, Bădescu D, Prioteasa LF, Csutak O, Cotar AI.	2020

**3.2.4. Studii, Rapoarte, Documente de fundamentare sau monitorizare care:****a) au stat la baza unor politici sau decizii publice:**

Tip document	Nr. total	Publicat în:
Hotărâre de Guvern		
Lege		
Ordin ministru		
Decizie președinte		
Standard		
Altele ( <i>se vor preciza</i> )		

**b) au contribuit la promovarea științei și tehnologiei - evenimente de mediatizare a științei și tehnologiei:**

Tip eveniment	Nr. apariții	Nume eveniment:
web-site	1	Simpozion Bioetica în experimentarea pe animale
web-site	1	Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”2020
Emisiuni TV		
Emisiuni radio		
Presă scrisă/electronică		
Cărți		
Reviste		
Bloguri		
Altele ( <i>se vor preciza</i> ) Facebook	1	Anunț premii Sesiunea Științifică Anuală a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”2020

**3.3. Tehnologii, procedee, produse informatice, rețele, formule, metode și altele asemenea:**

Tip	Nr. Total	2019	2020	2021	2022
Tehnologii					
Procedee					
Produse informatice					
Rețele					
Formule					
Metode	18	3	6	4	5
Altele asemenea ( <i>se vor specifica</i> )	3			2	1
Protocoale	10	2	2	5	1
Metodologii	1				1

**Din care:**

**3.3.1 Propuneri de brevete de invenție, certificate de înregistrare a desenelor și modelelor industriale și altele asemenea:**

	<b>Nr. propuneri brevete</b>	<b>Anul înregistrării</b>	<b>Autorul/Autorii</b>	<b>Numele propunerii de brevet</b>
OSIM	1	A/00691/17.11.2021	Giol Diana, Stăvaru Crina, Onu Adrian, Tofan Vlad, Caras Iuliana, Palela Mihaela, Amzuță Andreia, Mihalcea Alina, Costache Adriana, Floarea Mădălina, Tălpău Mădălina, Marinescu Mihaela, Ciulean Sonya,	1. Procedee de formulare și obținere a unor produse imunomodulatoare nanostructurate

**3.4. Infrastructuri de cercetare rezultate din derularea programului-nucleu. Obiecte fizice și produse realizate în cadrul derulării programului; colecții și baze de date conținând înregistrări analogice sau digitale, izvoare istorice, esanțioane, specimene, fotografii, observații, roci, fosile și altele asemenea, împreună cu informațiile necesare arhivării, regăsirii și precizării contextului în care au fost obținute:**

<b>Nr.</b>	<b>Nume infrastructură/obiect/bază de date</b>	<b>Data achiziției</b>	<b>Valoarea achiziției (lei)</b>	<b>Sursa finanțării</b>	<b>Valoarea finanțării din bugetul Progr. Nucleu</b>	<b>Nr. ore-om de utilizare a infrastructurii pentru Programul-nucleu</b>
1.	P0004-2285-W Biotech Degasi Compact Degasser 2-channel, 285 ul (Degazor)	06.11.2019	9163,00	PN 19 14 01 08	9163,00	180
2.	Colecție extracte ADN bacterian	-	-	PN 19 14 02 02	-	10-20
3.	Colecție extracte ARN viral	-	-	PN 19 14 02 02	-	5 -2
4.	Baza de date cu secvențe de genom întreg bacterii	-	-	PN 19 14 02 02	-	30 - 3
5.	Baza de date cu secvențe de genom întreg virusuri	-	-	PN 19 14 02 02	-	30 - 2
6.	Baza de date cu profile microbiotă intestinală	-	-	PN 19 14 02 02	-	30 - 3
7.	Pipete multicanal (3 buc)	13.11.2019	8032.5	PN 19 14 02 02	8032.5	0,2 - 12
8.	Microcentrifuga (1 buc)	19.11.2019	5438.3	PN 19 14 02 02	5438.3	0,2 - 12
9.	Sistem de detectie a virusului West Nile	26.10.2020	43.999,06	PN19 14 02 01	43999.06	20
10.	Vortex adapter for 6 (5 ml) tubes Qiagen, cod 13000-V1-5	25.09.2020	833,00	PN 19 14 02 02	833,00	0,1 - 10
11.	Agitator vortex	21.07.2020	1737.40	PN 19 14 02 02	1737.40	0,2 - 12
12.	CDC Biofilm Reactor cu agitator digital/ placa fierbinte (220-240 VAC)	07.12.2020	14.982,10	PN19 14 02 05		0

13.	Sistem de detecție a virusului West Nile	26.10.2020	43.999,06	PN19 14 02 01	43999.06	20
14.	Fluorimetru Qubit4	05.08.2020	19.325,60	PN 19140203 PN 19140102 PN 19140103 PN 19140104	19.325,60	100
15.	Fotometru	07.12.2020	6.650,91	PN 19 14 02 03	6650,91	
16.	Suport țintă pentru sistemul MALDI-TOF MS	29.07.2020	8853.6	PN 19 14 02 04	8853.6	
17.	Tinta pentru sistemul MALDI-TOF MS	29.07.2020	4284	PN 19 14 02 04	4284	
18.	Masina fulgi gheata	03.08.2021	14659.61	Nucleu	14659.61	400
19.	Obiectiv microscop 40X	21.11.2021	32901.0	Nucleu	32901.0	200
20.	Generator de azot 500 ml / min	27.10.2021	13607,06	PN 19 14 01 08	13607,06	70
21.	Densimat	28.07.2021	3897.25	PN19 14 02 05	3897.25	
22.	Laptop pentru sistem CytoSmart	16.06.2022	3499,99	PN19140104	3499,99	100

#### 4. Rezultatele programului-nucleu au fundamentat alte lucrări de cercetare:

	Nr.	Tip
<b>Proiecte internaționale</b>		- Horizon 2020: I-MOVE-COVID-19 : Multidisciplinary European network for research, prevention and control of the COVID-19 Pandemic - Vaccine Effectiveness, Burden and Impact Studies (VEBIS) of COVID-19 and Influenza
<b>Proiecte naționale</b>		PSCD al MApN

#### 5. Rezultate transferate în vederea aplicării :

Tip rezultat	Instituția beneficiară (nume instituție)	Efecte socio-economice la utilizator
<i>Transfer de cunoștințe</i>	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	<i>Introducerea în Laboratorul Control Calitate a tehnicilor de lucru cu linii celulare standardizate, ceea ce va permite realizarea de teste de control, cu impact economic și privind asigurarea calității în Inst Cantacuzino</i>
Informări timpurii asupra zonelor de risc epidemic de infecții cu virus West Nile	Primărie, INSP	Atenuarea riscului epidemic asupra sănătății publice
Proceduri operaționale	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Posibila introducere în portofoliul de analize cu plată efectuate de institut
Studiu microbiotă intestinală	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Instrumente de lucru în aplicațiile pentru sănătatea publică

Studii analiză genom întreg bacterian	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Instrumente de lucru în aplicațiile pentru sănătatea publică
Studiu analiză genom întreg viral	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Instrumente de lucru în aplicațiile pentru sănătatea publică
Studiu metagenom prin tehnica shotgun	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	Instrumente de lucru în aplicațiile pentru sănătatea publică
Metode	I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”	-Eficientizarea costurilor prin aplicarea unei metode adecvate de diagnostic al tusei convulsive. -Îmbunătățirea stării de sănătate a populației, prin aplicarea unei metode adecvate de diagnostic al tusei convulsive.

## 6. Alte rezultate:

Derularea programului nucleu a contribuit semnificativ la optimizarea, îmbunătățirea și creșterea capabilității instituționale pentru asigurarea unui diagnostic rapid și eficient.

Ratele ridicate de mutație și evoluția rapidă a virusuri respiratorii, care determină epidemii, conduc la apariția de variante, iar cercetările în acest domeniu, printr-un program susținut, ajută la identificarea lor. Derularea programului a permis optimizarea testărilor fenotipice de identificare a susceptibilității virusurilor gripale la antivirale (oseltamivir) și a celor de analiză genetică. Optimizarea și validarea reacției real-time RT-PCR pentru detecția moleculară a altor virusuri respiratorii permite identificarea lor chiar și în probe cu un conținut scăzut de virus.

Analiza sistematică a mutațiilor identificate la virusurile respiratorii este importantă pentru investigarea dinamicii transmiterii în populație pentru monitorizarea epidemiologiei moleculare la nivel național și internațional, identificarea noilor variante evolute cu rol în producerea vaccinurilor eficiente. Identificarea variantelor genomice și analizele filogenetice permit monitorizarea tulpinilor circulante precum și a potențialului de adaptare la organismele umane. Prin acest studiu au putut fi implementate metodele de nouă generație în laborator pentru analize aprofundate ale virusurilor respiratorii.

Validarea metodelor și elaborarea metodologiilor de lucru în laborator determină creșterea capacității de răspuns în cazuri de alertă microbiologică.

Studiile ulterioare privind secvențierea genetică vor ajuta la înțelegerea virusurilor în vederea alcătuirii ghidurilor de tratamente în viitor și posibil pentru evaluarea impactului intervențiilor medicale cu rol în îmbunătățirea stării de sănătate. Se impune continuarea supravegherii moleculare, coroborarea datelor de izolare, caracterizare antigenică, secvențiere a întregului genom pentru înțelegerea schimbărilor evolutive semnificative sau pentru identificarea de viitoare noi mutații care pot să genereze variante de îngrijorare.

Documentație operațională (instrucțiuni și protocoale de lucru), documentație privind tehnicile de lucru cu linii celulare (viitor manual de tehnici de biobanking), sesiuni de instruire simpozion „Bioetica în experimentarea pe animale”.

Participare work-shop instruire în utilizarea software-ului SeqSphere (Ridom Software), care este utilizat pentru analiza de genom bacterian întreg.

Posterul „Microbiota fecală a pacienților cu spondilită anchilozantă” a primit premiul I din partea Comitetului Științific al Sesiunii Științifice Anuale a I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino” 2020.

Experiența dobândită în acest proiect a contribuit la nominalizarea I.N.C.D.M.M. „Cantacuzino”, de către Ministerul Sănătății, ca entitate afiliată Institutului Național de Sănătate Publică pentru participarea la programul european EU4H-2022-DGA-MS-IBA-01-02, ”Direct grants to Member States authorities: enhancing whole genome sequencing (WGS) and/or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) national infrastructures and capacities to respond to the COVID-19 pandemic and future health threats (HERA). Sub-topic 2: Consolidation of WGS and RT-PCR activities aiming to ensure the sustainable use and integration of enhanced infrastructure into routine surveillance and outbreak investigation activities, in synergy with relevant on-going work at international level”.