

## RAPORTARE STIINTIFICA

### RST – Raport științific și tehnic în extenso

**Titlul proiectului:** *Antibiotic Resistance in Wastewater: Transmission Risks for Employees and Residents around Waste Water Treatment Plants / Rezistența la antibiotice în apele uzate: Riscuri de transmitere la angajați și la rezidenții din proximitatea stațiilor de tratare a apelor reziduale.*

**Acronimul proiectului:** AWARE-WWTP

**Cod proiect:** ERANET-JPI-EC-AMR -AWARE-WWTP

**Nr. Contract:** 26 din 01/06/2017

**Durata:** 36 luni (01.06.2017 – 30.05.2020)

**Director Proiect:** Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman

#### Parteneri

**1. Coordonator:** National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman

**2. Partener 1:** Klinikum der Universität München, Institute and Outpatient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine, München: Prof. Dr. Katja Radon, MSc

**3. Partener 2:** Ludwig-Maximilians-Universität München, Max von Pettenkofer-Institut, München: PD Dr. med. Andreas Wieser

**4. Partener 3:** University of Gothenburg, Institute of Biomedicine, Department of Infectious Diseases, Göteborg, Sweden: Prof. Dr. Joakim Larsson

**5. Partener 4:** Research Institute of the University of Bucharest, Faculty of Biology: Prof. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc

Cuprins	Pag.
1. <b>Obiective/Activități etapa 2017</b>	<b>2</b>
2. <b>Rezumatul etapei 2017 (maxim 2 pagini) – gradul de atingere a rezultatelor estimate</b>	<b>3</b>
3. <b>Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor etapei și gradul de realizare a obiectivelor (se vor indica rezultatele)</b> Act.1. Participarea la teleconferințele lunare Act.2. Obținerea avizului de etică din partea Comisiei de Etică a Universității din București Act. 3. Redactarea drafturilor procedurilor de operare standard (POS) care vor fi utilizate pe perioada proiectului Act. 4. Studii preliminare în vederea optimizării unor protocoale de analiză ce vor fi aplicate probelor de ape uzate în etapele următoare ale proiectului Act. 5. Selectarea SE care urmează a fi incluse în studiul epidemiologic	<b>5</b>
4. <b>Diseminarea rezultatelor</b>	<b>16</b>
5. <b>Bibliografie</b>	<b>17</b>

<b>Obiectivul etapei 1 / 2017</b>
Planificarea si pregatirea etapei de teren a studiului epidemiologic
<b>Activități</b>
Obținerea avizului de etică
Redactarea procedurilor de operare standard care vor fi utilizate pe perioada proiectului
Studii preliminare în vederea stabilirii protocoalelor de analiză ce vor fi aplicate probelor de apă uzată în etapele următoare ale proiectului

**1. Obiective/Activitati etapa 2017**

## 2. Rezumatul etapei

**Obiectivul** primei etape a proiectului AWARE-WWTP a fost **planificarea și pregătirea etapei de teren a studiului epidemiologic.**

În acest scop, au fost organizate **șaseteleconferințe lunare** la care au participat toți membrii consorțiului, în cadrul cărora s-au discutat aspecte legate de structura chestionarului care va fi utilizat în studiul epidemiologic (aprobarea structurii preliminare a chestionarului–întrebări aplicabile rezidenților și respectiv angajaților SE), structura *website*-ului, aprobarea logo-ului proiectului, selecția stațiilor de epurare a apelor reziduale, astfel încât să fie îndeplinit criteriul includerii în studiul epidemiologic a 100 de angajați ai SE și a 400 de rezidenți care locuiesc în imediata vecinătate a SE, perioadele campaniilor de prelevare probelor de apă uzată, materii fecale și aer (acestea au fost stabilite pentru a fi realizate în două campanii, în lunile de primăvară și toamnă ale anului 2018), volumul probelor analizate (în dezbateri), modalitatea de transport al probelor între parteneri, precum și conservarea acestora (-80°C), estimări preliminare ale numărului de analize microbiologice și moleculare care vor fi efectuate (partenerul român va procesa în cadrul acestui proiect cca 200 probe de apă, 900 de probe de materii fecale și 3000 de tulpini microbiene).

Pentru **obținerea avizului de etică** din partea Comisiei de Etică a Universității din București au fost completate **documentele solicitate**, respectiv **Anexa 1** – Cerere pentru avizul de etică, **Anexa 2**- Cercetare demarată sau finalizată fără aprobarea Comisiei de Etică a Cercetării, **Foaia de informare, Consimțământul informat.**

În cadrul acestei etape, partenerul român a realizat redactarea **drafturilor procedurilor de operare standard (POS)** care vor fi utilizate pe perioada proiectului, respectiv procedurile de recoltarea probelor de apă, analiza coliformi și *E. coli*, extracția ADN din probe de apă, aer, materii fecale, izolarea și identificarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze de spectru larg (ESBL) și carbapenemaze (CRE) din probe de apă și materii fecale, determinarea profilurilor de sensibilitate la antibiotice, evidențierea genelor ESBL și CRE prin PCR.

Partenerul român a realizat de asemenea **studii preliminare în vederea optimizării unor protocoale de analiză** ce vor fi aplicate probelor de ape uzate în etapele următoare a proiectului, respectiv **selecția mediilor de cultură** pentru analiza microbiologică a probelor de apă reziduală, **validarea metodei de izolare, identificare și cuantificare** a izolatelor producătoare de ESBL și CRE din probe de apă reziduală, cu probe de apă reziduală contaminate artificial cu bacterii rezistente. Determinarea domeniului de testare a metodei

membranei filtrante aplicate probelor de apă reziduală a arătat că un nivel de contaminare de  $10^6$  UFC/100 ml cu *E. coli* ATCC 25922 și respectiv *E. coli* 127 ESBL+ conduce la formarea de colonii ce pot fi cuantificate la diluția de  $10^{-3}$  pe mediu selectiv ESBL Brilliance agar, demonstrând că metoda membranei filtrante cu utilizarea acestui mediu cromogen prezintă un nivel de sensibilitate adecvat detecției în probe de apă reziduală a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL. De asemenea, analiza probelor de apă reziduală necontaminată și respectiv contaminată cu o tulpină de *E. coli* ESBL-negativă, prin metoda membranei filtrante utilizând mediul selectiv ESBL Brilliance agar nu a condus la apariția de colonii bacteriene, ceea ce indică specificitatea ridicată a metodei de analiză pentru detecția tulpinilor de *E. coli* ESBL+.

Partenerul român a demarat de asemenea activitatea de **selectare a SE, dintre stațiile de epurare orășenești cu treaptă secundară și terțiară de epurare și împrejurimile acestora**. Vor fi vizate în studiu SE din județele: Satu Mare, Sibiu, Suceava, Tulcea, Constanța, Vrancea, Dâmbovița, Ialomița, Ilfov, Gorj, Timiș, corespunzătoare principalelor regiuni de dezvoltare Nord-Vest, Centru, Nord-Est, Sud-Est, Sud-Muntenia, București – Ilfov, Sud-Vest Oltenia, Vest.

**Aprecierem că toate activitățile prevăzute pentru prima etapă a proiectului au fost îndeplinite.**

**3. Descrierea științifică și tehnică** cu punerea în evidență a rezultatelor etapei și gradul de realizare a obiectivelor; (se vor indica rezultatele)

### **Introducere**

Rezistența multiplă la antibiotice constituie în prezent o problemă de sănătate la nivel global. Utilizarea excesivă și/sau inadecvată a antibioticelor a condus la emergența de bacterii rezistente la majoritatea (rezistență extinsă) sau chiar la toate (panrezistență) antibioticele disponibile. Rezistența la antibiotice (RA) a fost considerată în primul rând o problemă de natură clinică, însă, recent numeroase date sugerează că alte medii, precum stațiile de epurare ale apelor reziduale, efluenții fabricilor de produse farmaceutice, acvacultura și fermele de animale pot fi rezervoare de bacterii rezistente și de gene de rezistență asociate (Thanner și colab., 2016). Astfel, introducerea continuă și necontrolată a antibioticelor în diferite medii naturale afectate de activitatea umană poate conduce la emergența unor noi mecanisme de RA și diseminarea acestora prin transfer orizontal de gene (Cabello, 2006; Penders și Stobberingh, 2008; Economou și Gousia, 2015; Wellington, și colab., 2013).

Stațiile de epurare ale apelor reziduale (SE) se caracterizează prin condiții adecvate pentru emergența bacteriilor multirezistente. Procesele de tratament ale apelor reziduale contribuie la intensificarea selecției, co-selecției și selecției încrucișate a determinantilor de RA ca urmare a expunerii continue a bacteriilor la substanțe antimicrobiene (Szczepanowski și colab., 2005; Xu și colab., 2015; Wellington, și colab., 2013). Analiza chimică a apelor reziduale provenite de la influenții din jurul fabricilor de antibiotice a relevat prezența compușilor de natură farmaceutică sau a derivaților acestora care părăsesc în cea mai mare parte stațiile de epurare a apelor reziduale, polând mediile naturale. Concentrații ridicate de antibiotice, precum oxitetraciclina sau ciprofloxacina, au fost detectate în apele reziduale provenite de la unitățile de producție a antibioticelor în China (Li și colab., 2008), India (Larsson, 2008) sau Pakistan (Guerin și colab., 2009). Un studiu epidemiologic amplu, realizat în SUA, ce a inclus monitorizarea produselor farmaceutice și a angajaților unei SE, a arătat antibioticele constituie a doua cea mai abundentă clasă de substanțe chimice, cel mai frecvent fiind întâlnite în ordinea descrescătoare a concentrației variind între:  $6.8 \pm 2.3$  și  $0.8 \pm 0.2$  mg kg<sup>-1</sup>: ciprofloxacina > ofloxacina > 4-epitetraciclina > tetraciclina > minociclina > doxiciclina > azitromicina (McClellan și Halden, 2010). Diferiți factori, ce includ originea influențului, condițiile de tratare, proprietățile antibioticelor, precum și condițiile de mediu influențează concentrațiile de antibiotice detectate (Hörsing și colab., 2011; Chen și colab., 2013; Li și colab., 2013).

Deasemenea, aceste ape reziduale conțin integroni și plasmide R conjugative, constituind rezervoare de gene de AR, ce pot fi diseminate în efluenți și astfel în medii acvatice naturale (râuri, lacuri), iar în cazul utilizării apei tratate pentru irigare în agricultură aceste gene de rezistență în ajung în sol, plante, animale (Pignato și colab., 2009).

Analiza comparativă a sensibilității la antibiotice a tulpinilor bacteriene izolate din aval și amonte de SE a arătat valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI) mai mari pentru șapte clase de antibiotice la izolatele din aval, confirmând faptul că substanțele antimicrobiene acționează ca factor de selecție a RA în interiorul SE.

Numeroase studii au demonstrat incidența crescută a RA în efluenții spitalelor (Reinthalder și colab., 2003; Kümmerer, 2004; Baquero și colab., 2008; Martinez, 2009; Czekalski și colab., 2012). Analiza comparativă enterococilor din efluenții primari și din apa reziduală tratată în SE care colectează efluenții pretratați industriali și din activități casnice a arătat o RA crescută a acestora la ciprofloxacina (33%), eritromocină (40%) și, respectiv, tetraciclină (57%) (Ferreira da Silvă M și colab., 2007). Baldini și Selzer (2008) au studiat prevalența și pattern-urile de RA la speciile de enterococi din apele estuarului Bahía Blanca și au arătat că 34% din tulpinile izolate au manifestat sensibilitate la toate antibioticele testate, rezultate care conduc spre ipoteza conform căreia tulpinile rezistente au provenit din medii spitalicești și ulterior s-au răspândit în mediile acvatice naturale.

SE constituie un mediu bogat din punct de vedere al nutrienților, în care populațiile microbiene și grupele de bacterii sunt expuse la fluctuații mari, din punct de vedere calitativ și cantitativ. Expunerea comunităților microbiene acvatice la diferiți factori favorizanți de rezistență, precum antibiotice, biocide, metale, gene de rezistență dar și patogeni conținând gene de rezistență la multiple antibiotice poate determina dezvoltarea de noi forme de rezistență. Proiectul AWARE-WWTP își propune a aborda una dintre cele mai relevante probleme pentru sănătatea publică reprezentată de RA în SE pentru identificarea căilor de transmitere a RE și a riscurilor de expunere, pentru propunerea de măsuri de reducere a acestora.

**Obiectivul** primei etape a proiectului AWARE-WWTP a fost **planificarea și pregătirea etapei de teren a studiului epidemiologic**. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele **activități**:

**Act.1. Participarea la teleconferințele lunare** în cadrul cărora s-au discutat aspecte legate de structura chestionarului care va fi utilizat în studiul epidemiologic (aprobarea

structurii preliminare a chestionarului– întrebări aplicabile rezidenților și respectiv angajaților SE), structura *website*-ului, aprobarea logo-ului proiectului, selecția stațiilor de epurare a apelor reziduale, astfel încât să fie îndeplinit criteriul includerii în studiul epidemiologic a 100 de angajați ai SE și a 400 de rezidenți care locuiesc în imediata vecinătate a SE, perioadele campaniilor de prelevare probelor de apă uzată, materii fecale și aer (acestea au fost stabilite pentru a fi realizate în două campanii, în lunile de primăvară și toamnă ale anului 2018), volumul probelor analizate (în dezbatere), modalitatea de transport al probelor între parteneri, precum și conservarea acestora (-80°C), estimări preliminare ale numărului de analize microbiologice și moleculare care vor fi efectuate (partenerul român va procesa în cadrul acestui proiect cca 200 probe de apă, 900 de probe de materii fecale și 3000 de tulpini microbiene).

## **Act.2. Obținerea avizului de etică din partea Comisiei de Etică a Universității din București**

În acest scop au fost completate **documentele solicitate**, respectiv **Anexa 1 – Cerere pentru avizul de etică, Anexa 2- Cercetare demarată sau finalizată fără aprobarea Comisiei de Etică a Cercetării, Foia de informare, Consimțământul informat.**

## **Act. 3.Redactarea drafturilor procedurilor de operare standard (POS) care vor fi utilizate pe perioada proiectului**

Au fost redactate POSde recoltare a probelor de apă;identificarea și determinarea numărului total de bacterii coliforme și a celulelor aparținând speciei *E. coli*; extracția ADN din probe de apă, aer, materii fecale; izolarea și identificarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze de spectru larg (ESBL) și carbapenemaze (CRE) din probe de apă și materii fecale; determinarea profilurilor de sensibilitate la antibiotice ale tulpinilor de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze de spectru larg (ESBL) și carbapenemaze (CRE); evidențierea genelor ESBL și CRE prin PCR.

**Act. 4. Studii preliminare în vederea optimizării unor protocoale de analiză ce vor fi aplicate probelor de ape uzate în etapele următoare ale proiectului**, respectiv selecția mediilor de cultură pentru analiza microbiologică a probelor de apă reziduală, validarea metodei de izolare, identificare și cuantificare a izolatelor producătoare de ESBL și CRE din probe de apă reziduală, cu probe de apă reziduală contaminate artificial cu bacterii rezistente.

#### **4.1. Analiza probelor de apă reziduală contaminate prin metoda membranei filtrante.**

Analizele microbiologice au fost efectuate utilizând metoda membranei filtrante (Novo și colab., 2013). Membranele filtrante prin care s-a realizat filtrarea unui volum de 10 ml din fiecare diluție zecimală ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  și  $10^{-6}$ ) de apă reziduală au fost incubate pe diferite medii de cultură pentru izolarea tulpinilor de *E.coli*. Diluțiile zecimale corespunzătoare unui număr de  $10^8$  UFC/ml vor fi selectate pentru analizele microbiologice și respectiv analiza de date. Toate experimentele au fost realizate în duplicat.

Determinarea domeniului de testare (validarea) a metodei de analiză a probelor de apă reziduală s-a efectuat utilizând tulpina microbiană de *E. coli* ATCC 25922 (tulpină de referință sensibilă la antibiotice) și respectiv tulpini de *E. coli* izolate din clinică, cu fenotip cunoscut de ESBL (*E. coli* 120 ESBL+ și *E. coli* 127 ESBL+).

Contaminarea artificială a probei de apă uzată s-a realizat cu suspensii bacteriene corespunzătoare standardului Mcfarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) obținute din culturi bacteriene de 18-24 ore pe mediu geloză simplă. Suspensiile și diluțiile au fost pregătite în ser fiziologic steril. Probele de apă contaminate artificial au fost constituite astfel încât să conțină aproximativ  $10^6$  UFC/100 ml apă reziduală (efluent), din fiecare tulpină bacteriană, în fiecare probă de apă uzată. S-a ales această valoare, deoarece densitatea celulelor de *E. coli* rezistente la cefotaxim în efluenții unui spital din Franța a fost estimată la  $10^5$  UFC/L (Drieux și colab., 2016).

Probele de apă reziduală analizate au fost reprezentate de:

- Proba 1 = apă uzată necontaminată, utilizată drept control
- Proba 2 = apă uzată contaminată cu *E. coli* ATCC 25922
- Proba 3 = apă uzată contaminată cu *E. coli* 127ESBL+
- Proba 4 = apă uzată contaminată cu *E. coli* ATCC 25922 și *E.coli* 127 ESBL+

Probele de apă reziduală și respectiv, probele contaminate au fost analizate prin metodă membranei filtrante. Astfel, din fiecare probă au fost realizate următoarele diluții zecimale:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  și  $10^{-6}$ , care ulterior au fost filtrate prin membrane filtrante (0.45  $\mu$ m, Millipore). Filtrele au fost apoi depuse pe mediu cromogen pentru coliformi totali (Coliforms Chromogenic Agar (CCA) ISO 9308 Pronadisa) și ESBL Brilliance agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (Galvin și colab., 2010) și incubate la 37°C timp de 18-24 de ore. Mediul de cultură ESBL Brilliance agar este un mediu cromogen utilizat pentru detecția bacteriilor producătoare de ESBL. Acest mediu asigură identificarea prezumtivă a tulpinilor *E. coli* și precum și a grupului KESC producătoare de ESBL direct din probele clinice. Conține



Cefpodoximă, în asociație cu alți agenți antibacterieni cu rol de a inhiba creșterea tulpinilor de *Enterobacteriaceae* non-ESBL. Diferențierea celor mai frecvente organisme producătoare de ESBL se obține prin includerea a doi agenți cromogeni specifici pentru două enzime. Grupul KESC exprimă *galactozidaza*, conducând la colonii de culoare verde. În schimb, tulpinile de *E. coli*, exprimă *galactozidaza* și *glucuronidaza*, conducând la formarea de colonii albastre; tulpinile de *E. coli*  $\beta$ -galactosidază - negative formează colonii roz.

## 4.2. Rezultate

### 4.2.1. Izolarea tulpinilor de *E. coli* din probele de apă reziduală contaminate artificial prin metoda membranei filtrante.

Analiza plăcilor cu mediu de cultură, inoculate cu membranele filtrante, a condus la următoarele rezultate:

Inocularea pe mediu cromogen CCA ISO 9308 Pronadisa a condus la creștere bacteriană în cazul tuturor probelor de apă reziduală analizate, la toate cele trei diluții zecimale însămânțate ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  și  $10^{-6}$ ). Probele de apă reziduală contaminate artificial au condus la formarea unui număr de unități formatoare de colonii, pe mediu de cultură respectiv, mai mare decât în cazul probei de apă reziduală necontaminată (tabelul 1, figura 1). Pe acest mediu de cultură s-au obținut trei tipuri de colonii: colonii albe, colonii roz caracteristice coliformilor și colonii albastru-închis, caracteristice tulpinilor de *E. coli*.

Tabelul 1. Determinarea numărului de UFC pe mediu cromogen pentru coliformi totali (CCA agar)

Proba 1 Apa reziduală necontaminată	Proba 2 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> ATCC 25922	Proba 3 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> 127 ESBL+	Proba 4 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> ATCC 25922 și <i>E. coli</i> 127 ESBL+
$1.4 \times 10^6$ UFC/10 ml	$10^7$ UFC/10 ml	$1.3 \times 10^7$ UFC/10 ml	$1.7 \times 10^7$ UFC/10 ml

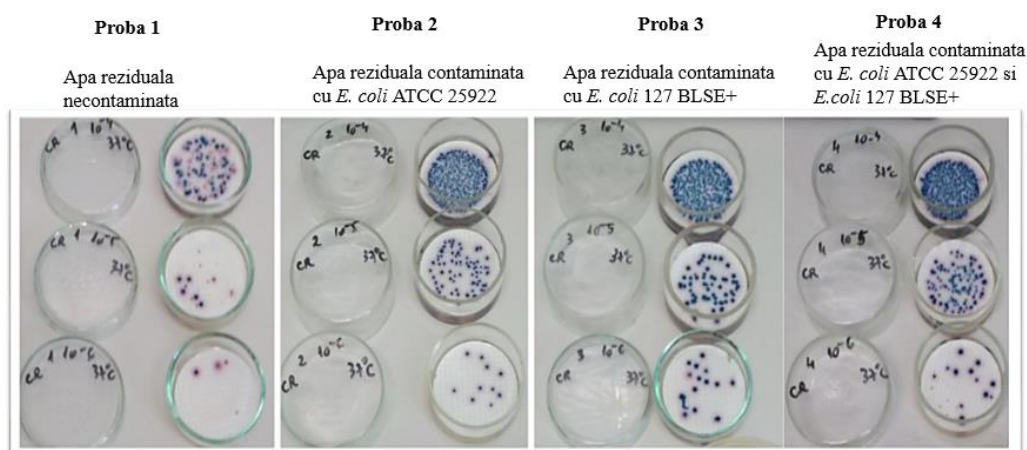


Figura nr. 1. Aspectul calitativ și cantitativ al culturilor bacteriene obținute pe mediul cromogen CCA.

Inocularea pe pe mediu ESBL Brilliance agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a condus la creștere bacteriană în cazul probelor de apa reziduală contaminată artificial cu tulpina de *E. coli* 127 ESBL+, la toate diluțiile zecimale însămânțate ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  și  $10^{-5}$ ). Probele de apa reziduală necontaminate și respectiv contaminate cu *E. coli* ATCC 25922 au prezentat o reducere semnificativă a creșterii bacteriene pe mediul ESBL Brilliance agar (figura 2, tabelul 2). Pe acest mediu de cultură s-au obținut colonii albastre și respectiv roz, corespunzătoare tulpinilor de *E. coli*.

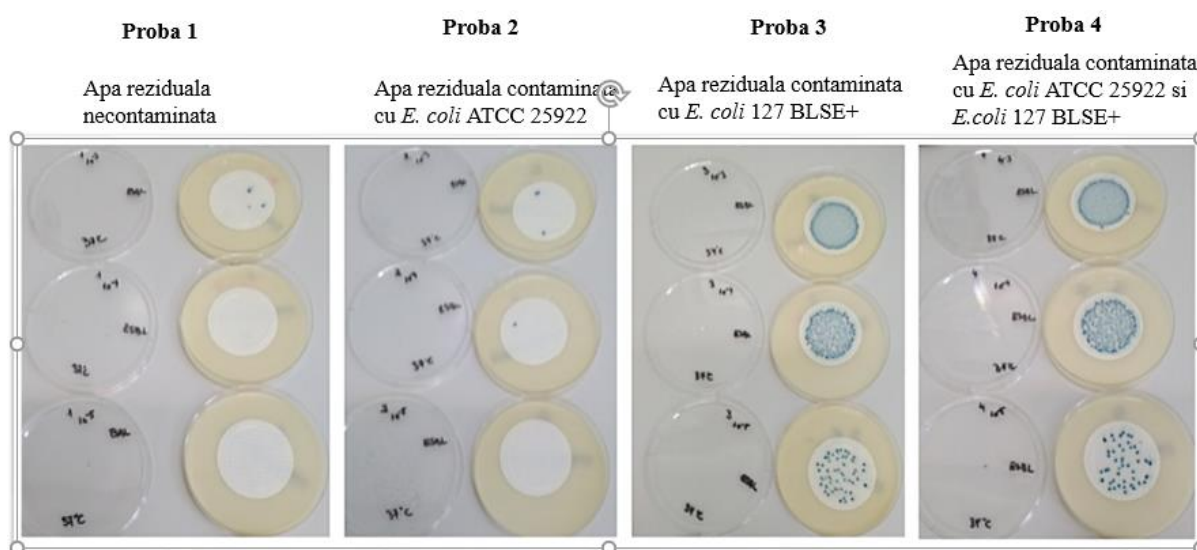


Figura nr. 2. Aspectul culturilor obținute pe mediul ESBL Brilliance agar.

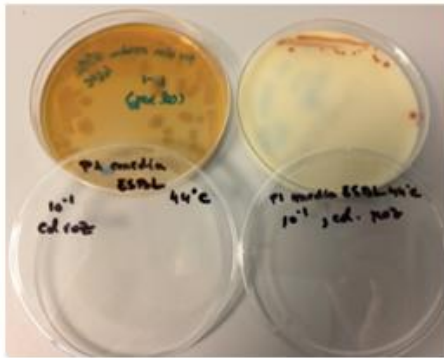
Tabelul 2. Determinarea numărului de UFC pe mediu cromogen ESBL Brilliance agar.

Proba 1 Apa reziduală necontaminată	Proba 2 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> ATCC 25922	Proba 3 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> 127 ESBL+	Proba 4 Apa reziduală contaminată artificial cu <i>E. coli</i> ATCC 25922 și <i>E. coli</i> 127 ESBL+
$3 \times 10^3$ UFC/10 ml	$2 \times 10^3$ UFC/10 ml	$5.6 \times 10^6$ UFC/10 ml	$4.7 \times 10^6$ UFC/10 ml

#### 4.2.2. Identificarea tulpinilor de *E. coli* din probele de apa reziduala contaminate artificial

Coloniile obținute pe mediul de cultură ESBL Brilliance agar au fost repicate în scopul identificării și determinării spectrului de sensibilitate la antibiotice. Mediile de cultură utilizate au fost reprezentate de: Muller Hinton sânge 5%, ESBL Brilliance agar și McConkey agar. Rezultatele sunt prezentate în figura 3 și figura 4.

**Proba 1**  
Apa reziduala  
necontaminata



**Proba 2**  
Apa reziduala contaminata  
cu *E. coli* ATCC 25922

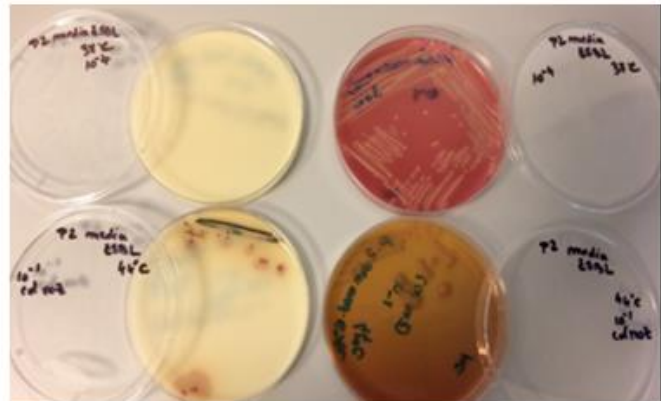
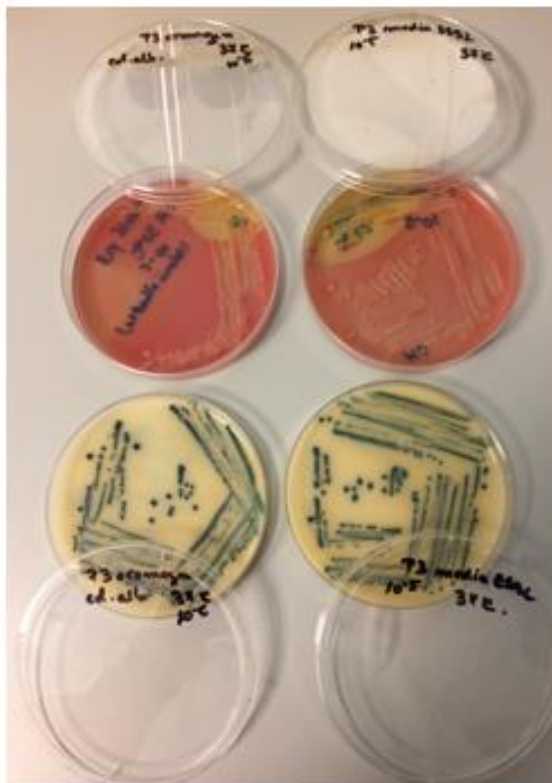


Figura nr. 3. Aspectul culturilor bacteriene obținute pentru proba 1 și respectiv proba 2 pe mediile de cultură McConkey și ESBL Brilliance agar. Pe mediul ESBL Brilliance agar se remarcă absența coloniilor de culoare albastră caracteristic tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL.

**Proba 3**  
Apa reziduala contaminata  
cu *E. coli* 127 BLSE+



**Proba 4**  
Apa reziduala contaminata  
cu *E. coli* ATCC 25922 și  
*E. coli* 127 BLSE+

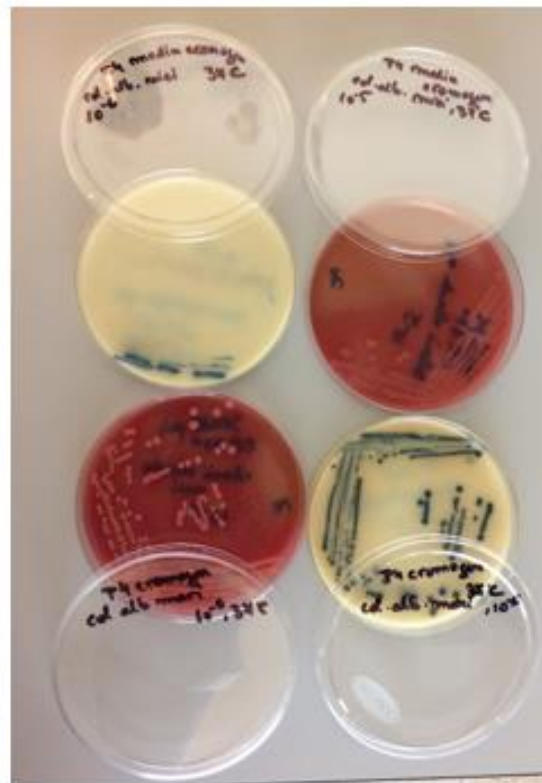


Figura nr. 4. Aspectul culturilor bacteriene obținute pentru proba 1 și respectiv proba 2 pe mediile de cultură McConkey și ESBL Brilliance agar. Pe mediul ESBL Brilliance agar se observă colonii de culoare albastră caracteristic tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL.

Izolatele bacteriene pentru care s-au obținut culturi microbiene caracteristice tulpinilor de *E. coli* (colonii albastre) pe mediul de cultură ESBL Brilliance agar, au fost ulterior analizate în vederea stabilirii spectrului de sensibilitate la antibiotice.

#### 4.2.3. Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice al tulpinilor de *E. coli* din probele de apă reziduala contaminate artificial

Testarea sensibilitatii la antibiotice s-a efectuat prin metoda difuzimetrică. Tulpinile de *E. coli* ATCC 25922 și *E. coli* 127 ESBL+, au fost utilizate ca tulpini control ESBL negativeși respectiv ESBL+. Rezultatele sunt prezentate în figurile 4 și 5.

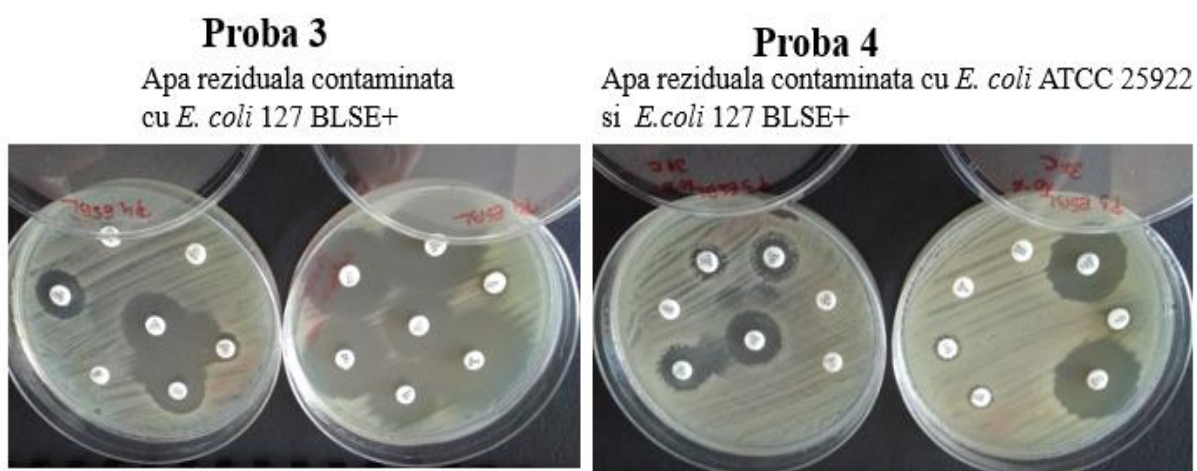


Figura nr. 4. Rezultatele testării sensibilității la antibiotice ale tulpinilor de *E. coli* izolate din probele de apă reziduală 3 (stânga) și respectiv 4 (dreapta). Se observă fenotipul ESBL, respectiv apariția unei zone de inhibiție mărite pentru discurile de cefalosporine datorită difuziei în mediu a acidului clavulanic cu acțiune inhibitorie asupra producerii de ESBL.

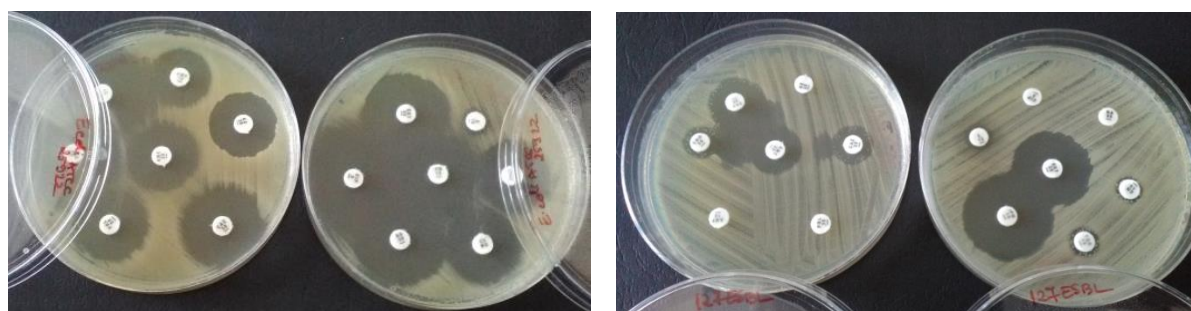


Figura nr. 5. Rezultatele testării sensibilității la antibiotice ale tulpinilor de *E. coli* ATCC 25922 (stânga) și *E. coli* 127 ESBL+. Se observă prezența fenotipului ESBL („dop de șampanie”) pentru tulpina de *E. coli* 127.

Rezultatele determinărilor spectrelor de sensibilitate la antibiotice au arătat că tulpinile de *E. coli* izolate din probele de apă reziduală contaminate artificial cu tulpina *E. coli* 127 ESBL+, au prezentat fenotipul de rezistență la beta-lactamice așteptat, prin producerea de ESBL (aspect caracteristic de „dop de șampanie”). De asemenea spectrul de sensibilitate la



antibiotice al tulpinii *E. coli*ESBL+ izolate din cele două probe de apă reziduală contaminate artificial a fost identic cu cel determinat pentru tulpina *E. coli* 127 ESBL+ (tabelu3. 3).

Tabelul 3. Rezultatele testării sensibilității la antibiotice ale tulpinilor de *E. coli* analizate

Antibiotic	SXT	NA	CIP	TOB	IMP	FEP	KZ	CRO	CAZ	PRL	AMP	AMC
Tulpina												
Proba 3 <i>E. coli</i> ESBL+	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
Proba 4 <i>E. coli</i> ESBL+	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
<i>E. coli</i> 127ESBL+	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

### 4.3. Concluzii

Determinarea domeniului de testare a metodei membranei filtrante aplicate probelor de apa reziduală a arătat ca un nivel de contaminare de  $10^6$  UFC/100 ml cu *E. coli* ATCC 25922 si respectiv *E. coli* 127 ESBL+ conduce la formarea de colonii ce pot cuantificate la diluția de  $10^{-3}$  pe mediu selectiv ESBL Brilliance agar, demonstrând că metoda membranei filtrante cu utilizarea acestui mediu cromogen prezintă un nivel de sensibilitate adecvat detecției în probe de apă reziduală a tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL. De asemenea, analiza probelor de apa reziduală necontaminatăși respectiv contaminată cu o tulpină de *E. coli* ESBL-negativă, prin metoda membranei filtrante utilizând mediul selectiv ESBL Brilliance agar nu a condus la apariția de colonii bacteriene, ceea ce indică specificitatearidicată a metodei de analiză pentru detecția tulpinilor de *E. coli* ESBL+.

### Act. 5. Selectarea SE care urmează a fi incluse în studiul epidemiologic

Partenerul român a demarat de asemenea activitatea de selectare a SE,astfel încât să fie îndeplinit criteriul includerii în studiul epidemiologic a 100 de angajați ai SE și a 400 de rezidenți care locuiesc în imediata vecinătate a SE. În acest scop, au fost sistematizate datele privind populația la 1 ianuarie 2017, după mediul de rezidență și regiunile de dezvoltare (Tabelul 4), numărul de locuitori cu locuințele conectate la sistemele de canalizare a apelor uzate(Tabelul 5), în funcție de tipul acestora (Tabelul 6).

Tabelul 4. Populația după domiciliu la 1 ianuarie pe medii de rezidență și regiuni de dezvoltare

Mediul de rezidență	Regiuni de dezvoltare și judete	Anul 2017
		Numar persoane

<b>Total</b>	<b>TOTAL</b>	<u>22222894</u>
-	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	<u>2835097</u>
-	<b>Regiunea CENTRU</b>	<u>2633952</u>
-	<b>Regiunea NORD-EST</b>	<u>3937780</u>
-	<b>Regiunea SUD-EST</b>	<u>2858951</u>
-	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	<u>3241845</u>
-	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	<u>2510417</u>
-	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	<u>2193472</u>
-	<b>Regiunea VEST</b>	<u>2011380</u>
<b>Urban</b>	<b>TOTAL</b>	<u>12519384</u>
-	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	<u>1536038</u>
-	<b>Regiunea CENTRU</b>	<u>1576619</u>
-	<b>Regiunea NORD-EST</b>	<u>1775795</u>
-	<b>Regiunea SUD-EST</b>	<u>1590460</u>
-	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	<u>1388076</u>
-	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	<u>2286461</u>
-	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	<u>1091876</u>
-	<b>Regiunea VEST</b>	<u>1274059</u>
<b>Rural</b>	<b>TOTAL</b>	<u>9703510</u>
-	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	<u>1299059</u>
-	<b>Regiunea CENTRU</b>	<u>1057333</u>
-	<b>Regiunea NORD-EST</b>	<u>2161985</u>
-	<b>Regiunea SUD-EST</b>	<u>1268491</u>
-	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	<u>1853769</u>
-	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	<u>223956</u>
-	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	<u>1101596</u>
-	<b>Regiunea VEST</b>	<u>737321</u>

Tabelul 5. Locuitorii cu locuințele conectate la sistemele de canalizare a apelor uzate, regiuni de dezvoltare

Sisteme de canalizare	Macroregiuni, regiuni de dezvoltare si judete	Anul 2016	
		UM: Numar persoane	
		Numar persoane	
Sisteme de canalizare	<b>TOTAL</b>	9702739	43.66%
	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	1241716	43.80%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	1387945	52.69%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	1108436	28.15%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	1280668	44.80%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	1054004	32.51%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	1891855	75.36%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	726229	33.11%
<b>Sisteme de canalizare cu epurare</b>	<b>TOTAL</b>	9415524	42.37%

	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	1219131	43.00%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	1330852	50.53%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	1093424	27.77%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	1229507	43.01%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	1036832	31.98%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	1830109	72.90%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	698255	31.83%
	<b>Regiunea VEST</b>	977414	48.59%
<b>Sisteme de canalizare fără epurare</b>	<b>TOTAL</b>	287215	1.29%
	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	22585	0.80%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	57093	2.17%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	15012	0.38%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	51161	1.79%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	17172	0.53%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	61746	2.46%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	27974	1.28%
	<b>Regiunea VEST</b>	34472	1.71%

Tabelul 6. Locuitorii cu locuințele conectate la sistemele de epurare a apelor uzate, regiuni de dezvoltare și județe

<b>Sisteme de canalizare si epurare a apelor</b>	<b>Regiuni de dezvoltare si judete</b>	<b>Anul 2016</b>	
		<b>Numar persoane</b>	<b>% din total populatie</b>
<b>Stații de epurare orășenești cu treaptă primară de epurare</b>	<b>TOTAL</b>	809266	3.64%
	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	33431	1.18%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	40435	1.54%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	105539	2.68%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	3962	0.14%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	311208	9.60%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	50421	2.01%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	198037	9.03%
	<b>Regiunea VEST</b>	66233	3.29%
<b>Stații de epurare orășenești cu treaptă secundară de epurare</b>	<b>TOTAL</b>	2054541	9.25%
	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	319760	11.28%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	532035	20.20%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	340375	8.64%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	234011	8.19%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	314443	9.70%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	42164	1.68%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	130157	5.93%
	<b>Regiunea VEST</b>	141596	7.04%

<b>Stații de epurare orășenești cu treaptă terțiară de epurare</b>	<b>TOTAL</b>	6551717	29.48%
	<b>Regiunea NORD-VEST</b>	865940	30.54%
	<b>Regiunea CENTRU</b>	758382	28.79%
	<b>Regiunea NORD-EST</b>	647510	16.44%
	<b>Regiunea SUD-EST</b>	991534	34.68%
	<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	411181	12.68%
	<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	1737524	69.21%
	<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	370061	16.87%
	<b>Regiunea VEST</b>	769585	38.26%

SE vor fi selectate dintre stațiile de epurare orășenești cu treaptă secundară și terțiară de epurare și împrejurimile acestora. Vor fi vizate în studiu SE din județele: Satu Mare, Sibiu, Suceava, Tulcea, Constanta, Vrancea, Dâmbovița, Ialomița, Ilfov, Gorj, Timiș, corespunzătoare principalelor regiuni de dezvoltare Nord-Vest, Centru, Nord-Est, Sud-Est, Sud-Muntenia, Bucuresti – Ilfov, Sud-Vest Oltenia, Vest (Tabelul 7).

Tabelul 7. SE epurare orășenești cu treaptă secundară și terțiară de epurare vizate pentru a fi incluse în studiul epidemiologic și împrejurimile acestora

<b>Regiune de dezvoltare</b>	<b>Judete vizate</b>	<b>Operator apa-canal</b>
<b>Regiunea NORD-VEST</b>	Satu Mare	APASERV Satu Mare
<b>Regiunea CENTRU</b>	Sibiu	Apa Canal SA Sibiu
<b>Regiunea NORD-EST</b>	Suceava	ACET SA Suceava
<b>Regiunea SUD-EST</b>	Tulcea Constanta Vrancea	AQUASERV SA Tulcea RAJA Constanta CUP SA Focsani
<b>Regiunea SUD-MUNTENIA</b>	Dambovita Ialomita	Compania de Apa Targoviste ECOQUA Calarasi
<b>Regiunea BUCURESTI - ILFOV</b>	Ilfov	Apa Canal Ilfov
<b>Regiunea SUD-VEST OLTENIA</b>	Gorj	APA REGIO GORJ SA
<b>Regiunea VEST</b>	Timis	AQUATIM Timisoara

## **Act. 6. Activități de diseminare**

Unele dintre metodele optimizate în cadrul acestei etape au fost utilizate pentru obținerea rezultatelor publicate în articolul Lazar, V., Curutiu, C., Lia-Mara, D., Holban, A., Gheorghe, I., Marinescu, F., Ilie, M., Ivanov, A., Dobre, D. and Chifiriuc, M. (2017) Physico-Chemical and Microbiological Assessment of Organic Pollution in Plain Salty Lakes from Protected Regions. *Journal of Environmental Protection*, **8**, 1474-1489. doi: 10.4236/jep.2017.812091. care citează proiectul ERANET-0296-JPI-EC-AMR-AWARE-WWTP la Acknowledgements ([https://file.scirp.org/Html/5-6703434\\_80568.htm#txtF5](https://file.scirp.org/Html/5-6703434_80568.htm#txtF5)).



## Bibliografie

1. Drieux, L., Haenn, S., Moulin, L., & Jarlier, V. (2016). Quantitative evaluation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5: 9.
2. Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M. (2010) Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(14):4772-4779.
3. Ana Novo, Sandra Andre, Paula Viana, Olga C. Nunes, Celia M. Manaia. (2013) Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research* 47 1875-1887.
4. Thanner S., Drissner D., Walsh F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio* 7:e2227-15 10.1128/mBio.02227-15
5. Cabello F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8: 1137–1144.
6. Penders J., Stobberingh E. E. (2008). Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of the Netherlands. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 31:261–265.
7. Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8: 49–61.
8. Wellington, Elizabeth MH et al. (2015). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2): 155 - 165
9. Li D, Yang M, Hu J, Ren L, Zhang Y, Li K Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environ Toxicol Chem.* 2008 Jan; 27(1):80-6.
10. Larsson DG, de Pedro C, Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater.* 148(3):751-5.
11. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science*. 324(5930):1034.
12. Hörsing M., Ledin A., Grabic R., Fick J., Tysklind M., la Cour Jansen J., et al. (2011). Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Res.* 45: 4470–4482.
13. Li W., Shi Y., Gao L., Liu J., Cai Y. (2013). Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. *Sci. Total Environ.* 44 306–313. 10.1016/j.scitotenv.2012.12.050
14. Chen Y., Yu G., Cao Q., Zhang H., Lin Q., Hong Y. (2013). Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge. *Chemosphere* 93:1765–1772.
15. McClellan K., Halden R. U. (2010). Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Res.* 44: 658–668.
16. Ferreira da Silva M., Vaz-Moreira I., Gonzalez-Pajuelo M., Nunes O.C., Manaia C.M (2007). Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(1):166-76

17. Baldini M., Selzer P. (2008). Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from estuarine waters. *Rev Argent Microbiol.* 40(1):48-51
18. Szczepanowski R., Braun S., Riedel V., Schneiker S., Krahn I., Pühler A., et al. (2005). The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology(Reading, Engl.)*151:1095–1111.
19. Xu J., Xu Y., Wang H., Guo C., Qiu H., He Y., et al. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*119 1379–1385.
20. Reinthaler F. F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckenbauer G., Mascher F., Marth E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.*37: 1685–1690
21. Kümmerer K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*54: 311–320
22. Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012). Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3, 106.
23. Pignato S, Coniglio MA, Faro G, Weill FX, Giammanco G. (2009). Plasmid-mediated multiple antibiotic resistances of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J Water Health.* 2:251–258.