

RST – Raport științific și tehnic *in extenso*

**Titlul proiectului: Aspecte transcriptomice ale interacțiunilor gazdă-patogen-antibiotic la
Drosophila melanogaster infectat cu patogeni ESKAPE (TRANSCEND)
cod PN-III-P4-PCE-2021-1797, contract 96/2022**

RST – Raport științific și tehnic rezumat - etapa I

Obiectivele și activitățile prevăzute

Ob1. Evaluarea efectului fenotipic al celulelor bacteriene Gram-negative ESKAPE și al antibioticelor colistin și carbapeneme asupra liniilor de tip sălbatic de *D. melanogaster* și simularea unor scenarii diferite de infecție cu încărcături bacteriene diferite

1.1 Inocularea liniilor de *D. melanogaster* cu colistin și carbapeneme de diferite concentrații;

1.2 Infectarea liniilor de *D. melanogaster* cu diferite tulpini ESKAPE cu suspensii bacteriene de diferite densități;

1.3 Optimizarea parametrilor infecțiilor experimentale pentru fiecare patogen ESKAPE;

1.4 Identificarea răspunsurilor fiziologice a liniilor de *D. melanogaster* inoculate/infectate;

1.5 Evaluarea compoziției și diversității microbiotei *D. melanogaster* cu ajutorul secvențierii genelor care codifica pentru ARNr 16S/18S;

1.6 Analiza și interpretarea datelor.

Rezumatul etapei 1

În cadrul primei etape a proiectului, au fost realizate integral toate activitățile prevăzute pentru îndeplinirea obiectivului etapei. Astfel, s-a realizat stabilirea parametrilor inoculărilor cu antibiotice și ai infecțiilor experimentale pentru fiecare patogen ESKAPE, optimizarea liniilor de *D. melanogaster* care vor fi utilizate în etapele următoare, identificarea răspunsurilor fiziologice ale indivizilor de *D. melanogaster* considerați, precum și analiza prin metode independente de cultivare a microbiotei liniilor de *D. melanogaster* inoculate/infectate. Fluxul de lucru optimizat în cadrul acestei etape și care va fi utilizat în etapele următoare ale proiectului este sintetizat în Figura 1.

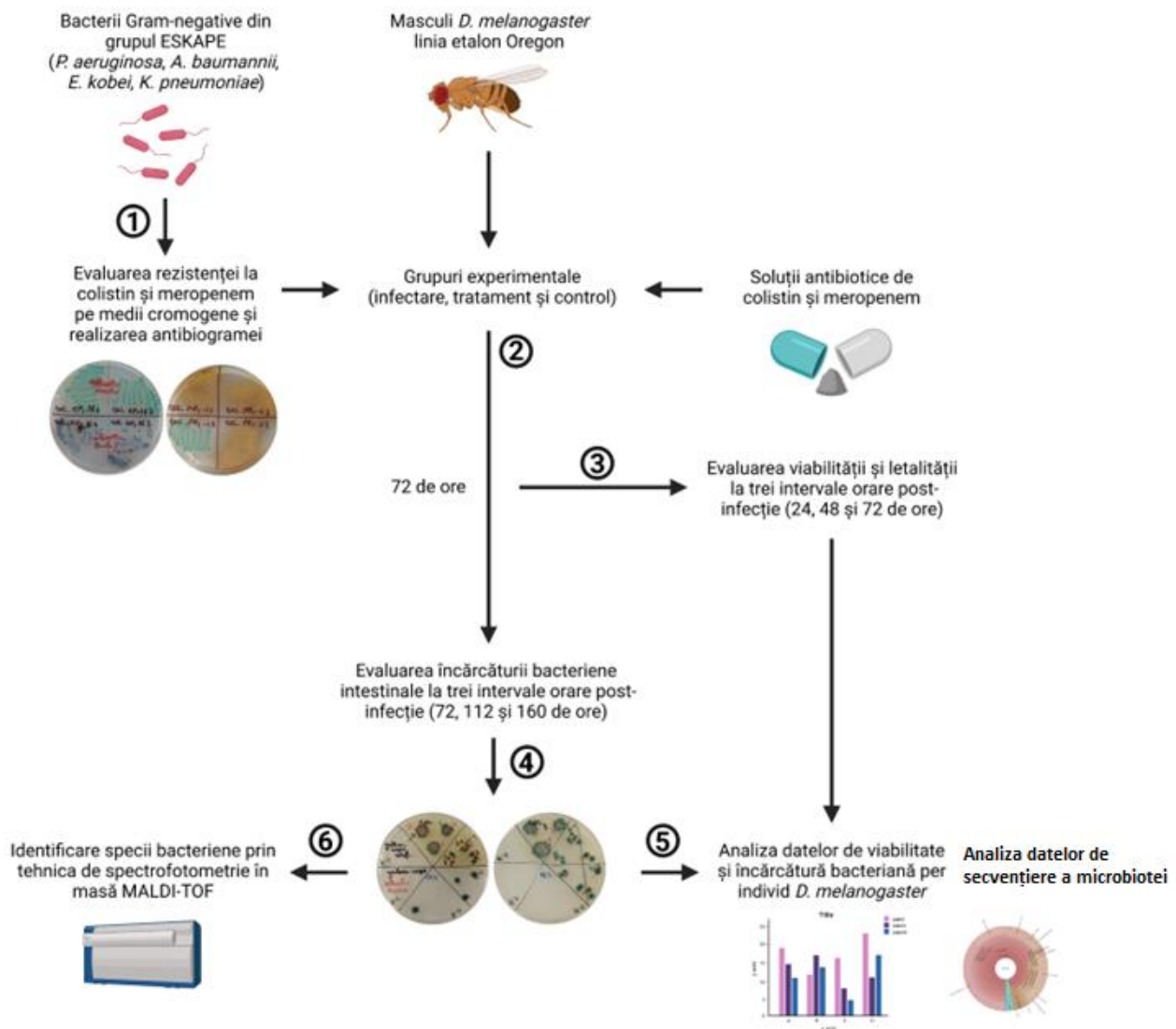


Figura 1. Reprezentarea grafică a fluxului experimental optimizat în Etapa I a proiectului.

Pentru inoculările cu antibiotice și infecțiile experimentale se vor utiliza în primul rând masculi adulți, din linia de tip sălbatic (etalon) Oregon; în cazuri particulare, pentru confirmarea anumitor ipoteze de lucru (e.g., drosofilele mutante pentru gene implicate în răspunsul imun vor răspunde diferit la infecții/tratamente cu antibiotice comparativ cu tipul sălbatic, normal) se vor utiliza de asemenea femele Oregon și alte linii de *D. melanogaster*, optimizate în cadrul primei etape. Pentru infecțiile experimentale se vor utiliza patru tulpini multirezistente de bacili Gram-negativi din grupul ESKAPE, caracterizate anterior la nivel genetic, care prezintă profiluri complexe de gene de rezistență, virulență și elemente genice mobile. Densitatea inocului bacterian utilizat pentru infectarea experimentală prin ingestă va fi de $4,5 \times 10^9$ UFC, iar durata intervalului de ingestă de 72 de ore. Parametrii fiziologici, precum viabilitatea, mobilitatea și manifestarea geotropismului negativ vor fi monitorizați la 24, 48 și 72 de ore. În funcție de valorile concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) pentru colistin și meropenem față de tulpinile ESKAPE selectate, a fost standardizată concentrația de antibiotice care va fi administrată prin ingestă, respectiv 256 $\mu\text{g/mL}$ pentru meropenem și 32 $\mu\text{g/mL}$ pentru colistin. Rezultatele obținute în urma administrării antibioticelor/infecțiilor cu bacterii ESKAPE demonstrează letalitatea scăzută și lipsa modificărilor de comportament la masculii *D. melanogaster*, ceea ce va permite modularea perioadei de infecție, astfel încât să putem surprinde de o manieră optimă interacțiunile dintre tulpinile infectante, microbiota intestinală și organismul gazdă.

Pentru evaluarea diversității microbiotei la *D. melanogaster* cu ajutorul secvențierii genelor pentru ARNr 16S s-a realizat optimizarea protocolelor pentru izolarea și purificarea ADN din *D. melanogaster*, obținerea și secvențierea bibliotecilor de ampliconi utilizând sistemul Ion Torrent PGM și kitul Ion Sequencing 400 (Life Technologies). Totodată, au fost implementate optimizări și pentru analiza datelor obținute, pentru determinarea compoziției și a diversității microbiotei, în funcție de *background*-ul genetic, sex și tratamentul cu antibiotice (colistin, meropenem).

Analizele preliminare evidențiază niveluri ridicate de *Enterobacteriaceae* și *Pseudomonadaceae* la toate liniile analizate, care prezintă rezistență intrinsecă la antibioticele selectate pentru studiu, dar în același timp, ar putea funcționa ca receptori de gene de rezistență de la tulpinile ESKAPE, aparținând aceluiași familii, utilizate pentru infecțiile experimentale. Abundența bacteriilor din familiile *Enterobacteriaceae* și *Pseudomonadaceae* este diminuată în urma tratamentului cu cele două antibiotice. Această dinamică este favorabilă pentru demersul nostru experimental, deoarece ne va permite să evidențiem rolul microbiotei comensale în transmiterea și diseminarea rezistenței în absența, respectiv în prezența tratamentelor cu antibiotice.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele au fost diseminate prin participarea la o conferință internațională cu prezentare orală și publicarea a trei articole ISI, în reviste cu FI>6. S-a realizat pagina *web* a proiectului, actualizată cu datele generale despre proiect și cu rezultatele obținute în prima etapă.

Adrese website proiect

- Pagina în RO - <https://unibuc.ro/cercetare/promovarea-rezultatelor-cercetarii/proiecte-de-cercetare/proiecte-cu-finantare-nationala/transcend/>
- Pagina în ENG - <https://unibuc.ro/cercetare/promovarea-rezultatelor-cercetarii/proiecte-de-cercetare/proiecte-cu-finantare-nationala/transcend/?lang=en>

Articole ISI care citează proiectul la Acknowledgements

1. Chifiriuc MC, Filip R, Constantin M, Pircalabioru GG, Bleotu C, Burlibasa L, Ionica E, Corcionivoschi N and Mihaescu G (2022). Common themes in antimicrobial and anticancer drug resistance. *Front. Microbiol.* 13:960693. doi: 10.3389/fmicb.2022.960693, **FI 6**.
2. Ecovoiu, A.A.; Bologa, A.M.; Chifiriuc, D.I.M.; Ciuca, A.M.; Constantin, N.D.; Ghionoiu, I.C.; Ghita, I.C.; Ratiu, A.C. Genome ARTIST_v2—An Autonomous Bioinformatics Tool for Annotation of Natural Transposons in Sequenced Genomes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23,12686. <https://doi.org/10.3390/ijms232012686>, **FI 6.2**.

Conferințe internaționale

1. Chifiriuc M.C. - *Drosophila melanogaster* - a Versatile Model for Human Cancer Research, 2nd OncoHub Conference, Romania, 21-23 sept. 2022 (<https://www.oncohub.ro/agenda>)