

## **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 II**

### **Obiectivele și activitățile prevăzute:**

#### **Ob2. Evaluarea comparativă *in vivo* și *in vitro* a expresiei a genelor specific pentru rezistența la antibiotice**

2.1 Realizarea infecțiilor experimentale în condiții optimizate din punct de vedere al densității inoculelor bacteriene, doza infectantă, doza de antibiotic și durata infecției experimentale

2.2 Cultivarea tulpinilor bacteriene pe medii artificiale, cu sau fără antibiotice

2.3 Evaluarea prin qRT-PCR a genelor țintă pentru rezistența patogenilor la antibiotice

2.4 Evaluarea modificărilor de microbiotă la *D. melanogaster* prin tehnici independente de cultivare în timpul infecției și/sau a tratamentului cu antibiotice

2.5 Analiza și interpretarea datelor

#### **Ob3. Identificarea profilurilor de expresie particulare unor gene eucariotice în indivizi *D. melanogaster* infectați versus neinfecțați, netratați și tratați cu antibioticul colistin**

3.1 Efectuarea infecțiilor experimentale în condiții optimizate

3.2 Efectuarea qRT-PCR pentru gene țintă la *D. melanogaster*

3.3 Analiza și interpretarea datelor

## Rezumatul etapei II

În cadrul etapei II a proiectului au fost realizate toate activitățile prevăzute pentru îndeplinirea obiectivelor corespunzătoare acestei etape. Astfel, s-au realizat experimente de infecție experimentală și/sau tratamentul indivizilor *D. melanogaster* de interes în condiții optimizate, cultivarea tulpinilor bacteriene recuperate, evaluarea prin qRT-PCR a expresiei genice la tulpini bacteriene și la indivizi *D. melanogaster*, și evaluarea profilului microbiotei comensale prin tehnici independente de cultivare. Fluxul de lucru al acestei etape este prezentat în Figura 1.

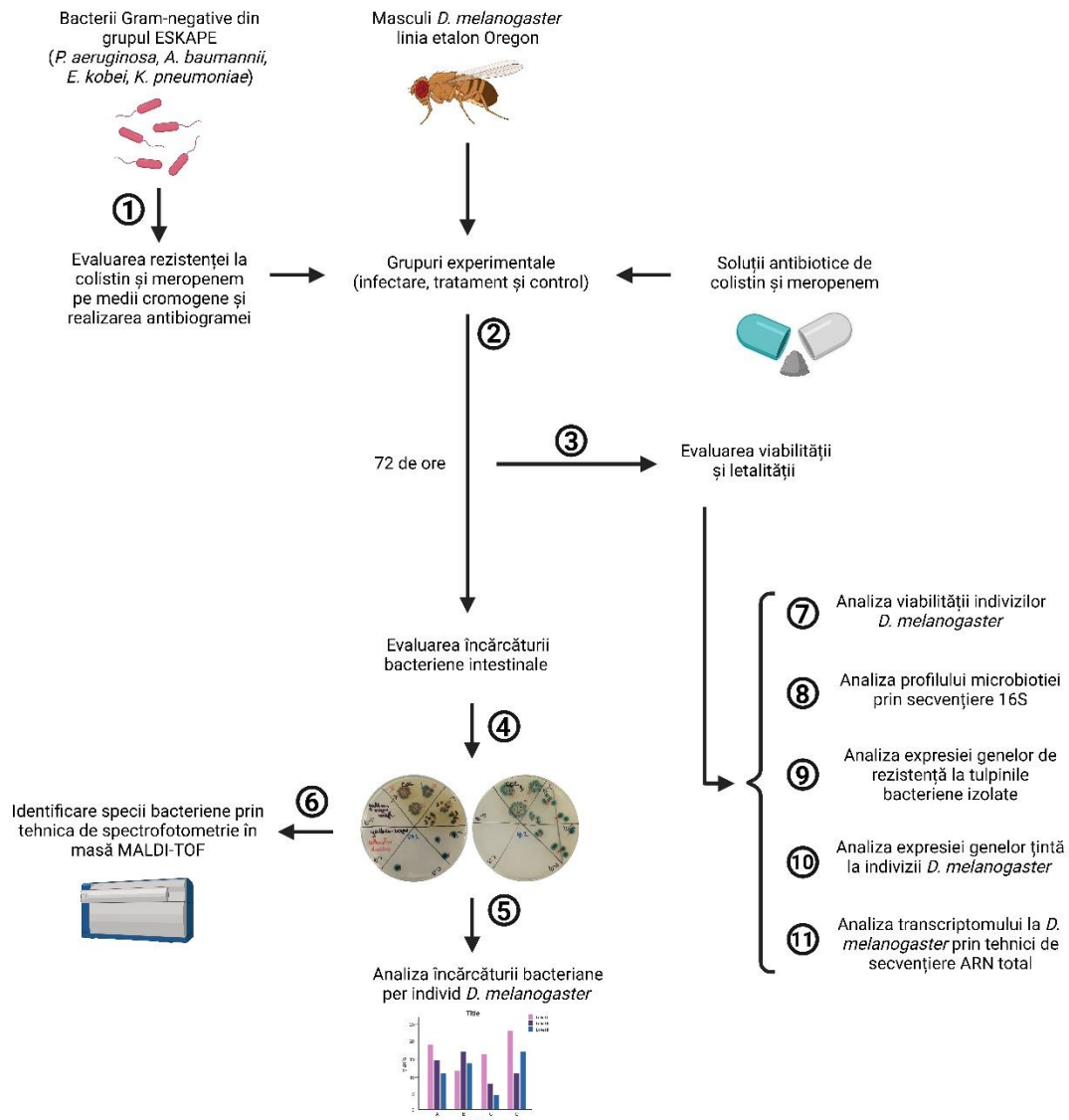


Figura 1. Reprezentare grafică sumarizată a fluxului experimental din Etapa II a proiectului.

În cadrul activităților au fost realizate o serie de experimente în care masculii de *Drosophila melanogaster* au fost contaminați cu tulpini bacteriene cu sau fără administrare ulterioară de antibiotice. Pentru efectuarea infecțiilor experimentale au fost utilizate seturi de indivizi cu trei genotipuri distincte, respectiv linia etalon Oregon și indivizi mutanți cu genotipurile  $\gamma COP^{S057302}/+$ , respectiv  $\gamma COP^{14a}/\gamma COP^{14a}$  și următoarele variante experimentale: i) control, ii) infecție, iii) infecție + tratament cu colistin/meropenem. Inoculul bacterian a fost reprezentat de suspensii bacteriene cu o densitate de  $4,5 \times 10^9$  unități formatoare de colonii (UFC), realizat în soluție sucroză 5%, care a fost omogenizată și adăugată pe discurile de hârtie de filtru din tuburile experimentale. Pentru grupurile control a fost pipetat un volum similar de soluție sucroză 5%.

Tratamentul cu antibioticele de ultimă intenție a condus la selectarea de colonii rezistente de *Providencia rettgeri* pe mediul COL-APSE, suplimentat cu colistin, la 18 ore post-tratament în toate condițiile experimentale. În cadrul experimentului de infecție cu *A. baumannii* au fost recuperate colonii rezistente pe medii suplimentate cu antibiotice în majoritatea condițiilor experimentale, iar după infecția cu *E. kobei* au fost obținute colonii rezistente de *E. kobei* pe mediul mSuperCARBA pentru toate condițiile experimentale și colonii de *P. rettgeri* pe COL-APSE.

Evaluarea expresiei genelor țintă KPC și CTX-M din genomurile patogenilor rezistenți s-a realizat pe indivizi de *D. melanogaster* infectați cu *E. kobei* cu/fără tratament cu colistin. S-a observat ca în cazul indivizilor infectați cu *E. kobei* expresia genelor KPC și CTX-M este crescută, în timp ce după administrarea colistinului, aceasta este diminuată, scăderea fiind semnificativă în cazul genei KPC.

Pentru a ghida selectarea unor gene țintă de interes care să fie utilizate în realizarea experimentelor de qRT-PCR am optat inițial pentru o etapă de *screening highthroughput* cu tehnica *direct RNA sequencing* dezvoltată de ONT. Consecutiv, nivelul de expresie a genelor *Relish* și *dorsal* pentru diferite variante experimentale a fost evaluat pentru masculi mutanți  $\gamma COP^{S057302}/+$  infectați cu *E. kobei* și tratați cu colistin. În cazul experimentului, expresia genelor *Relish* și *dorsal* este stimulată în urma infecției cu *E. kobei*, iar consecutiv administrării de colistin expresia ambelor gene este diminuată.

Evaluarea modificărilor microbiotei indivizilor de *D. melanogaster* în timpul infecției cu *A. baumannii* și/sau tratamentului cu antibiotic prin metode s-a bazat pe secvențierea specifică a genelor care codifică pentru ARNr 16S, utilizând în premieră națională ONT. Datele experimentale preliminare conduc la ipoteza ca anumite alele mutante ale genei *gammaCop* pot modula, direct sau indirect, pattern-ului microbiotei comensale la *D. Melanogaster*, în sensul favorizării unei prodominanțe a bacteriilor Gram-negative, inductoare ale unui status pro-inflamator.

## Diseminarea rezultatelor

Rezultatele au fost diseminate prin publicarea a trei articole ISI, două articole BDI și prin participarea la conferințe internaționale sau conferințe și *workshop*-uri naționale. Pagina *web* a proiectului a fost actualizată cu rezultatele obținute în a doua etapă a proiectului.

## Articole ISI

1. Barbu, I.C.; Gheorghe-Barbu, I.; Grigore, G.A.; Vrancianu, C.O.; Chifiriuc, M.C. Antimicrobial Resistance in Romania: Updates on Gram-Negative ESCAPE Pathogens in the Clinical, Veterinary, and Aquatic Sectors. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7892. <https://doi.org/10.3390/ijms24097892>.
2. Trușcă, B.S.; Gheorghe-Barbu, I.; Manea, M.; Ianculescu, E.; Barbu, I.C.; Măruțescu, L.G.; Dițu, L.-M.; Chifiriuc, M.-C.; Lazăr, V. Snapshot of Phenotypic and Molecular Virulence and Resistance Profiles in Multidrug-Resistant Strains Isolated in a Tertiary Hospital in Romania. *Pathogens* **2023**, *12*, 609. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040609>.
3. Ionascu, A.; Ecovoiu, A.A.; Chifiriuc, M.C.; Ratiu, A.C. qDATA - an R application implementing a practical framework for analyzing quantitative Real-Time PCR data. In Press.

## Articole BDI

1. Vrâncianu, C.O.; Gheorghe-Barbu, I.; Czobor Barbu, I.; Măruțescu, L.; Popa, M.; Niță-Lazăr, M.; Muntean, A.A.; Dragomirescu, C.; Săndulescu, O.; Talapan, D.; Sidoroff, M.E.; Tusa, I.M.; Popa, M.I.; Chifiriuc, M.C. Antibiotic resistance profiles in *Acinetobacter Baumannii* strains isolated from wastewater in southern Romania. *Romanian archives of microbiology and immunology* **2022**, *81* (4) 257-263.

## Conferințe internaționale

1. Muntean A.; Chifiriuc M.C. *Evolution and implications of antibiotic resistance in veterinary and environmental sectors - key issues for a One Health approach* Int. Conference One Health-One Earth, 24-25.11. 2023, Cluj Napoca, Romania

## Conferințe și *workshop*-uri naționale

1. Chifiriuc, M.C. Antimicrobial drug resistance – research directions at the Faculty of Biology. ZIM, Bucuresti, 18 Sept. 2023
2. Chifiriuc, M.C. Roles of microbiota in oncologic patient management. Interacțiuni interdisciplinare la frontiera medicinei personalizate. SMART DIASPORA, Timișoara, Apr. 2023
3. Chifiriuc, M.C. Omul și microbiomul: între Eros și Thanatos. Noi frontiere și provocări ale abordărilor transdisciplinare – Analiza și Controlul Dinamicii Sistemelor Celulare. SMART DIASPORA, Timișoara, Apr. 2023
4. Constantin, N.D.; Ionașcu, A.; Rațiu, A.C.; Chifiriuc, M.C.; Barbu, I.C.; Csutak, O.; Ecovoiu, Al.A. Analiza răspunsurilor fiziologice la infecții bacteriene și tratament cu meropenem ale masculilor din linia Oregon de *Drosophila melanogaster*. Sesiunea de Comunicări Științifice a Studenților Facultății de Biologie, București, 12 mai 2023.

5. Ionașcu, A.; Constantin, N.D.; Rațiu, A.C.; Chifiriuc, M.C.; Barbu, I.C.; Gheorghe-Barbu, I.; Ecovoiu, Al.A. Evaluarea prin metode dependente de cultivare a încărcăturii microbioene la masculi de *D. melanogaster* infectați cu tulpini patogene multirezistente sau tratați cu colistin. Sesiunea de Comunicări Științifice a Studenților Facultății de Biologie, București, 12 Mai 2023.
6. Chifiriuc, M.C.; Ionașcu, A.; Constantin, N.D.; Rațiu, A.C.; Gheorghe-Barbu, I.; Barbu, I.C.; Ecovoiu, Al.A. Experimental setup optimizations for evaluating microbiome antibiotic interactions in *D. melanogaster* model. CIVIS Summer School, Drug Design and Discovery, București, 7 Iulie 2023.
7. Rațiu A.C.; Ecovoiu A. Studii de genomică și bioinformatică pe modelul experimental *Drosophila melanogaster*, Prima ediție a Conferinței Anuale de Comunicare a Rezultatelor Cercetării la Universitatea din București, 23-24.02.2023
8. Constantin, N.D.; Ionașcu, A.; Barbu, I.C.; Ecovoiu, Al.A.; Gheorghe-Barbu, I.; Grădișteanu Pircalabioru, G.; Rațiu, A.C.; Chifiriuc, M.C. Utilizarea *Drosophila melanogaster* pentru modelarea experimentală a unor infecții bacteriene. Conferința Anuală de Comunicare a Rezultatelor Cercetării la Universitatea din București, 17 Noiembrie 2023.