

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**PERSPECTIVE ALE DIAGNOSTICULUI BAZAT PE TEHNICA
MICROCALORIMETRIEI ÎN INFECȚIILE ORTOPEDICE
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR STREINU-CERCEL ADRIAN

Student-doctorand:

POPA MIHNEA-IOAN-GABRIEL

2019

Cuprins

A. Problema fundamentală	4
B. Contribuții personale.....	6
1. Patologia infecțioasă musculo-scheletală într-o secție de ortopedie și traumatologie din România	6
1.1 Introducere.....	6
1.2 Materiala și metode	6
1.3 Rezultate	6
1.4. Concluzii.....	9
2. Demonstrarea variabilității și reproductibilității metodei microcalorimetrice, utilizând tulpini de referință (ATCC).....	9
2.1 Introducere.....	9
2.2. Materiale și metode	9
2.2.1 Protocolul de lucru standard	10
2.3. Rezultate	11
2.4 Discuții.....	15
2.5. Concluzii	15
3. Descrierea și evaluarea curbelor de creștere microcalorimetrice a <i>Candida albicans</i> în condiții experimentale diferite	16
3.1 Introducere.....	16
3.2. Materiala și metode	16
3.2.1 Populația fungică	16
3.2.2 Protocol de lucru.....	16
3.2.3. Pregătirea probelor microcalorimetrice.....	17
3.3. Rezultate	17
3.4 Discuții	20
3.5. Concluzii	20
4. Studii microcalorimetrice ale interacțiunii dintre <i>Salmonella spp.</i> și bacteriofagul specific	20
4.1 Introducere.....	20
4.2 Materiale și metode	21
4.2.1 Populația bacteriană	21
4.2.2. Protocol de lucru.....	21
4.3. Rezultate	21
4.4. Discuții	26
4.5 Concluzii	28
5. Elaborarea unor curbe microcalorimetrice de creștere bacteriană utilizând agenți microbieni prelevați din focare de infecție în sistemul musculo-scheletal	28

5.1 Introducere.....	28
5.2. Materiale și metode	28
5.2.1 Protocol de lucru.....	29
5.3. Rezultate	29
5.4. Discuții	32
5.5. Concluzii	34
6. Utilizarea sonicării implantelor infectate pentru dezangrenarea celulelor bacteriene combinată cu diagnosticul utilizând tehnici de biologie moleculară.....	34
6.1. Introducere.....	34
6.2. Materiale și metode	35
6.2.1. Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene	35
6.3. Rezultate	35
6.5. Discuții	38
6.6. Concluzii	39
7. Concluziile tezei de doctorat și contribuțiile proprii.....	39
13.1. Concluziile tezei	39
13. 2. Contribuții personale	41

A. Problema fundamentală

Ortopedia și Traumatologia, în concordanță cu alte specialități medicale, sunt într-o continuă dezvoltare, impresionantă, intrinsec legată de evoluția tehnologică. Mai mult decât în alte ramuri, aici progresul tehnologic devine evident și prin frecvența utilizare a implantelor sau materialelor de osteosinteză. (1) Printr-o simplă căutare în literatura de specialitate se poate observa o creștere exponențială a operațiilor de artroplastie, în corelație cu creșterea duratei de viață la nivel populațional, implicând îmbunătățirea calității vieții, inclusiv prin menținerea sau creșterea mobilității la un nivel satisfăcător. (2) În același timp, datorită creșterii numărului accidentelor de circulație și a celor sportive, utilizarea articulațiilor artificiale și implantelor pentru osteosinteză va crește constant. (3-4) Protezele și materialele de osteosinteză folosite în tratarea patologiilor degenerative, în tratarea celor traumatice și chiar și din motive estetice, sunt realizate din materiale cu o biocompatibilitate apreciată drept foarte bună. (5-6)

În domeniul luat în discuție, medicina modernă folosește instrumente și implantate pentru a favoriza evoluția pacienților. Dar, pe măsură ce crește utilizarea materialelor străine implantate, este de așteptat să fie evidențiată și o creștere a numărului de complicații legate de aceste dispozitive medicale. (6-7) La ora actuală se apreciază de către unii autori că aproape jumătate din toate infecțiile asociate îngrijirilor medicale sunt în strânsă legătură cu utilizarea diverselor dispozitive medicale. (8) Aceste infecții apar fie prin diseminarea la distanță, pe cale hematogenă, fie prin contiguitate de la nivelul țesuturilor de vecinătate. Modul de abordare în cazul acestor patologii este unul complicat și complex, implicând activitatea în echipă, multidisciplinară. (9-12) În cazul în care diagnosticul nu se pune rapid iar tratamentul nu este realizat cu celeritate după debutul infecției, evoluția poate fi extrem de dificilă și cu potențial grav. (11-15)

Sursa infecției ar putea fi un implant contaminat, ar putea depinde de erori în dezinfecție și sterilizare, sau se poate regăsi la distanță. Din aceste considerente, în cazul intervențiilor chirurgicale suspicate, este obligatoriu să investigăm, să identificăm și să tratăm orice focar infecțios. (17, 20) Sunt amintite studii care arată că infecțiile ortopedice sunt mai frecvente la pacienții cu un abces dentar sau o patologie infecțioasă la nivelul tegumentului sau tubului digestiv. Există numeroși agenți microbieni implicabili, dintre care amintim: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), stafilococii coagulază negativi,

Escherichia coli, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. Dintre aceștia. *S. aureus* este cel mai frecvent implicat. (7-8, 10-14, 16-20)

O metodă care a reușit să câștige teren este microcalorimetria. Microcalorimetria, frecvent utilizată în chimia anorganică, a început să capete contur și în medicină. Aceasta poate să fie folosită în prezent cu succes, având o sensibilitate foarte mare, detectând modificări de temperatură de ordinul micro-nanoJoulilor. Este de subliniat și faptul că în momentul de față există atât sisteme de achiziționare a datelor cât și programe (*software*) de analiză și coroborare a datelor. Putem realiza studii precise, într-un timp relativ scurt. Capacitatea bacteriilor de a degaja căldură prin activitatea metabolică este fundamentul cercetării doctorale, microcalorimetrul putând să înregistreze energia degajată datorită reacțiilor biochimice exoterme și pe baza lor cu ajutorul programului de integrare să genereze curbe de creștere care ulterior să fie interpretate, în context clinic. (21-24)

Microcalorimetria bacteriană prezintă o serie de avantaje ce o recomandă drept o posibilă metodă de diagnostic rapid și eficient. Sensibilitatea este un atu important. Microcalorimetric se pot decela semnale ale multiplicării bacteriene chiar și atunci când este prezent un număr infim de microorganisme. În afară de punerea în evidență a prezenței microorganismelor, curba generată, are caracteristici ce facilitează identificarea agentului patogen implicat. Metoda oferă informații în timp real: putem să verificăm evoluția creșterii bacteriene în orice moment, prin intermediul unui calculator sau chiar și de la distanță, cu ajutorul unui telefon (*smart-phone*).

Posibilitatea utilizării microcalorimetriei în domeniul medical este încă în stadiul de cercetare. În lucrarea de față sunt prezentate și cercetările autorului, în domeniul descris.

Studiile, obiectivele specifice fiecărui studiu, metodologia de cercetare individuală se regăsesc în secțiunea *Contribuții personale*.

B. Contribuții personale

1. Patologia infecțioasă musculo-scheletală într-o secție de ortopedie și traumatologie din România

1.1. Introducere

Am urmărit identificarea agenților infecțioși cel mai frecvent implicați, determinarea susceptibilității / rezistenței acestora la antibiotice și chimioterapice precum și încercarea identificării unor factori care să explice apariția acestor patologii. Am dorit în același timp elaborarea unei lucrări care să treacă în revistă, pe scurt, majoritatea dificultăților care pot să apară atunci când este tratat un caz de infecție în sfera ortopediei, oferind informații generale, aplicabile pentru prevenirea acestora.

1.2. Materiale și metode

Am realizat acest studiu epidemiologic asupra infecțiilor identificate la pacienți tratați în secția de ortopedie și traumatologie din SUUB, în intervalul ianuarie 2016-iunie 2019. Cu ajutorul programului informatic al SUUB am putut extrage date despre pacienți, cu stricta păstrare a confidențialității.

Informațiile căutate au implicat în primul rând agentul patogen cauzator de infecție și sensibilitatea/rezistența la antibiotice a acestuia, însă în același timp am încercat construirea un istoric cât mai atent, al fiecărui pacient, pentru a putea determina cauza infecției și riscurile determinate de diversele patologii asociate.

Pacienții sub vârsta de 18 ani nu au intrat în studiu. Atunci când un pacient a prezentat mai multe internări, având aceeași patologie tratată secvențial, am coroborat informațiile astfel încât să nu apară multiplicarea datelor.

1.3. Rezultate

Pe parcursul a 4 ani am reușit să identific 133 de pacienți care au suferit o infecție la nivelul sistemului musculo-scheletal. În majoritatea cazurilor au fost infecții mono-microbiene, însă au existat 6 cazuri în care au fost identificați doi agenți patogeni. În graficele pe care le-am realizat prezint susceptibilitatea și respectiv rezistența agenților microbieni față de antibioticele utilizate în mod curent în cadrul laboratorului de microbiologie al SUUB. În concordanță cu informațiile din literatură, bacteriile cele mai frecvent identificate au fost din genul *Staphylococcus*, urmate de enterobacterii și de germeni nonfermentativi. Au existat și 2 infecții determinate de enterococi (fig. 1.1.).

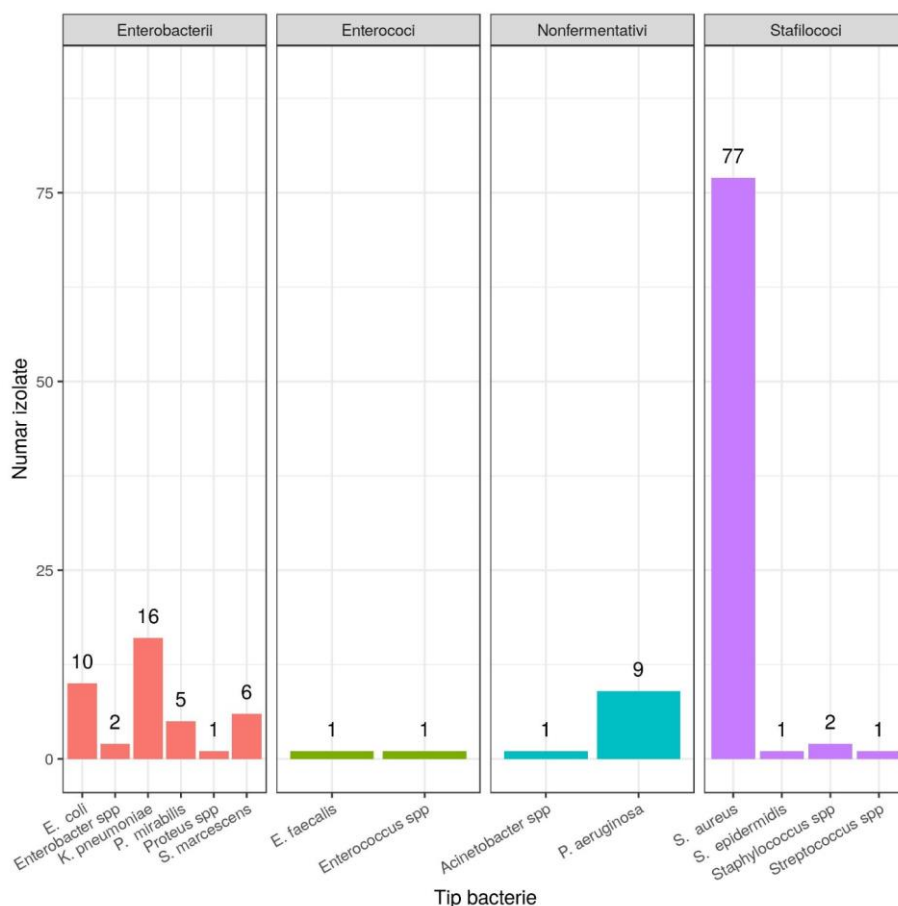


Fig.1.1. – Reprezentare grafică a tulpinilor bacteriene izolate, în perioada 2016-2019

Cel mai frecvent implicat a fost *Staphylococcus aureus* (77 de cazuri). La pacienții vârstnici cu deficit de mobilizare și care asociau patologii în sfera bronhopulmonară sau urogenitală au fost identificate: 16 tulpini de *Klebsiella pneumoniae*, 10 de *Escherichia coli*, 9 de *Pseudomonas aeruginosa* și 6 tulpini de *Proteus mirabilis*. În cazul pacienților politraumatizați care au suferit accidente cu energii înalte și care au fost internați și pe secția de ATI s-au izolat în 6 cazuri tulpini de *Serratia marcescens*. Au fost identificate și alte tipuri de microorganisme, însă într-un număr foarte mic, cu o semnificație statistică redusă. (fig. 1.2.).

Evaluând datele statistice nu observăm o diferență semnificativă statistic atunci când ne raportăm la sexul pacienților. Distribuția vârstei lotului de pacienți nu diferă semnificativ de o distribuție normală Gaussiană (testul Shapiro-Wilk: $p=0.53$), deși observăm două vârfuri de incidență, la 62 și 75 de ani. Vârsta medie a pacienților a fost de 63 de ani, cu o deviație standard de 15 ani. Majoritatea infecțiilor au apărut la persoane cu vârste cuprinse între 30 și 80 de ani, cele mai multe cazuri fiind identificate la persoanele

de peste 50 de ani. Pacienții cu vârste cuprinse între 30 și 50 de ani sunt persoane active, cu risc crescut de angajare în diferite activități care pot produce fracturi. În cazul pacienților cu vârste cuprinse între 50 și 80 de ani, comorbiditățile pot să crească riscul apariției unei infecții. (fig. 1.3.)

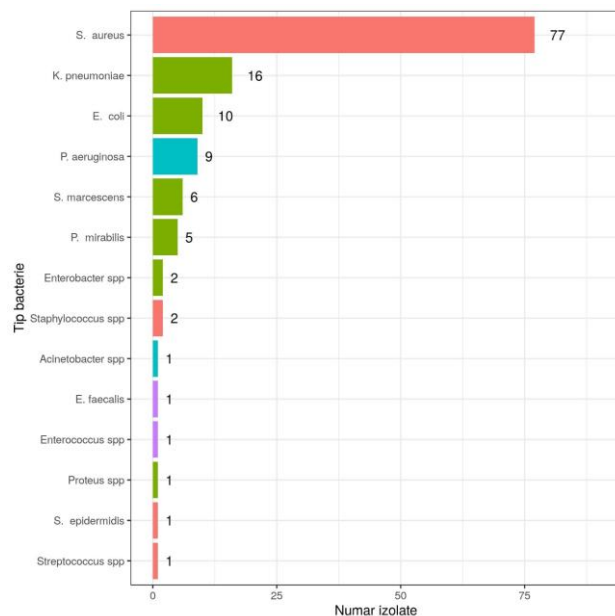


Fig. 1.2. - Reprezentare grafică a tulpinilor bacteriene izolate, în funcție de gen, în perioada 2016-2019

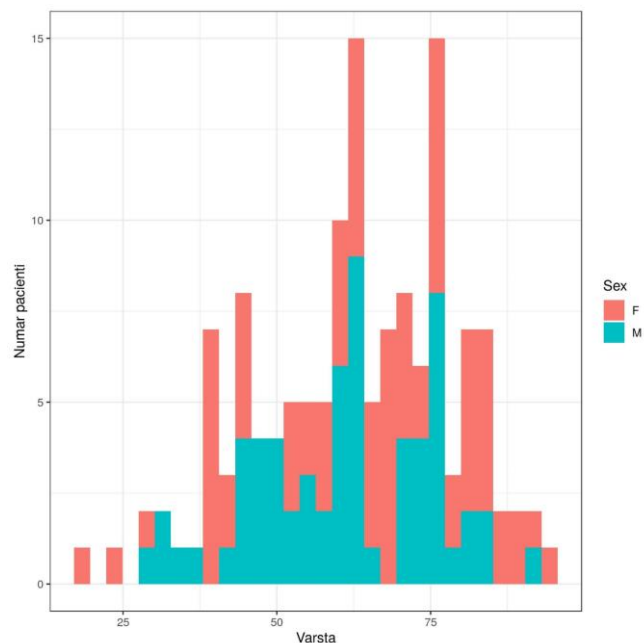


Fig. 1.3. – Distribuția pacienților cu infecții în sfera ortopedică, internați în SUUB, pe vârste și sex, în perioada 2016-2019

1.4. Concluzii

Infecțiile din sfera ortopediei și traumatologiei reprezintă o latură a acestei specialități care, fără un diagnostic rapid și instituirea unui tratament ținut, pot să conducă la efecte dezastruoase, cu implicații atât asupra pacienților cât și asupra sistemelor de sănătate. Acest tip de patologie nu este extensiv documentată, numărul de publicații pe această temă este relativ restrâns atât în literatura din România cât și în cea internațională.

Informațiile prezentate în acest studiu sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate atât în privința agenților microbieni identificați și rezistenței acestora, cât și privind comorbiditățile și factorii de risc înregistrați.

Datele strânse, atât cele referitoare la bacteriile izolate, a informațiilor legate de pacienți, cât și a informațiilor din literatură, pot să fie utilizate pentru a înțelege mai bine acest tip de patologie având scopul de a preveni sau a o trata.

2. Demonstrarea variabilității și reproductibilității metodei microcalorimetrice, utilizând tulpini de referință (ATCC)

2.1. Introducere

Având în vedere utilizarea a două aparate capabile să realizeze înregistrări microcalorimetrice cu un singur canal, capacitatea de înregistrare este limitată la un singur experiment per exercițiu. Deoarece o înregistrare microcalorimetrică poate să aibă o durată variabilă în funcție de bacteria, mediul și cantitatea de substanță introdusă în celula microcalorimetrică, reproductibilitatea este esențială pentru a realiza experimente superpozabile, interpretabile statistic.

Obiectivul studiului a fost elaborarea unor experimente microcalorimetrice cu diferite tipuri de tulpini bacteriene standardizate (ATCC) pentru a demonstra reproductibilitatea metodei de investigare a dezvoltării bacteriene prin înregistrarea curbelor de creștere determinate de activitatea metabolică, cu ajutorul microcalorimetriei.

2.2. Materiale și metode

În teza doctorală vor fi prezentate experimente microcalorimetrice realizate în diferite condiții de mediu și de temperatură, utilizând agenți microbieni liofilizați sau recoltați de la pacienți operați pentru infecții în sfera ortopedică. Am ales să expun în paginile ce urmează metoda de bază utilizată în prepararea probelor pentru ca ulterior, în funcție de caz, să detaliez modificările aduse în funcție de scopul experimentului.

Pentru experimentele realizate în scopul descrierii reproductibilității am utilizat următoarele microorganisme: *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, *Escherichia coli* - ATCC 25922, *Salmonella* Ø1, *Candida albicans* - ATCC 10231 și *Klebsiella pneumoniae* - ATCC 700603. Mediile utilizate pentru bacterii au fost trypticase soy agar (TSA) și Mueller-Hinton (MH), iar pentru *Candida albicans* am utilizat mediul Sabourand (fig. 2.1.). Pentru această parte a studiului doctoral am redactat doar experimentele realizate la 37° C, cu un volum de încărcare a celulelor microcalorimetrice de 600 µl. Singura variabilă care a trebuit modificată a fost diluția în care au fost introduse microorganismele la începutul experimentului, pentru că ritmul de creștere diferă.

2.2.1 Protocolul de lucru standard

Sunt descrise etapele de bază parcurse pentru realizarea unui experiment.

1. **Pregătirea unei culturi lichidiene** – Pentru realizarea unui experiment de succes agentul microbial de investigat trebuie să fie repicat proaspăt, în ziua anterioară experimentului (dacă are un timp de diviziune de circa 20-30 minute). Mediul lichid este însămânțat din colonia izolată sau dintr-o altă cultură pură. După inoculare acesta este introdus în termostaț și lăsat să se dezvolte pentru o perioadă de 22-24 ore.

NB. Pregătirea probelor se realizează în hota cu flux laminar.

2. **Pregătirea agentului microbial pentru diluție**

- a. Se extrag 1.000 µl din mediul însămânțat în ziua precedentă și se introduc într-un tub Eppendorf; cu ajutorul unei centrifugi se separă materialul solid de cel lichid. Procesul de centrifugare se realizează la 2.000 rotații per minut (rpm) timp de 4 minute;

- b. După separare, se extrage lichidul și se introduc 1.000 µl mediu proaspăt după care se vortexează și se repetă punctul a. Acest proces este repetat pentru a extrage pe cât posibil bacteriile neviabile și a elimina metaboliții secundari, ce nu contribuie efectiv ca substrat de creștere bacterian.

- c. Se extrage lichidul și se introduc 200 µl mediu proaspăt în tubul Eppendorf după care se realizează resuspensia prin vortexare; această soluție va fi utilizată ulterior pentru pregătirea probei, în funcție de indicele McFarland.

3. **Pregătirea probei**

- a. Într-un tub nefelometric se introduc 3.000 µl de mediu proaspăt, aflat la temperatura camerei.

- b. Tubul nefelometric se șterge cu acetonă pentru a elimina riscul apariției viciilor de refracție.
- c. Se măsoară indicele McFarland.
- d. Se pipetează, în funcție de agentul microbial studiat, în jur de 5 μ l din tubul Eppendorf în tubul nefelometric până când indicele McFarland atinge valoarea corespunzătoare microorganismului studiat.
- e. În funcție de agentul microbial utilizat se realizează diluții, etapă care va fi descrisă în funcție de experiment.
- f. Se extrage volumul propus din soluția realizată și se introduce în celula microcalorimetrică care se sigilează folosind tehnică aseptică cu un *o-ring* de silicon și se introduce în microcalorimetru.

4. Pregătirea referinței

- a. Se pregătește o soluție din apă distilată și pulbere de antibiotic.
- b. Se introduce volumul de mediu proaspăt propus în celula microcalorimetrică peste care se adaugă, în volum de 10%, o cantitate de soluție conținând antibiotic.
- c. Se sigilează celula cu *o-ring* de silicon și se introduce în microcalorimetru.

5. Finalizarea experimentului

- a. După terminarea experimentelor toate produsele biologice sunt introduse într-o cuvă care conține apă distilată și cloramină pentru a dezinfecta instrumentarul folosit.

După terminarea unui experiment celulele microcalorimetrice sunt introduse într-o baie de sonicare timp de 15 minute pentru ca apoi să fie sterilizate într-un autoclav la 126° C și stocate în hota de lucru.

2.3. Rezultate

Am utilizat tulpini bine caracterizate (ATCC) a 4 bacterii (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* și *Salmonella spp.*) și o tulpină fungică (*C. albicans*). Experimentele au fost realizate menținând o temperatură constantă de 37° C; mediile de cultură folosite au fost MH pentru bacterii și Sabouraud pentru *C. albicans*.

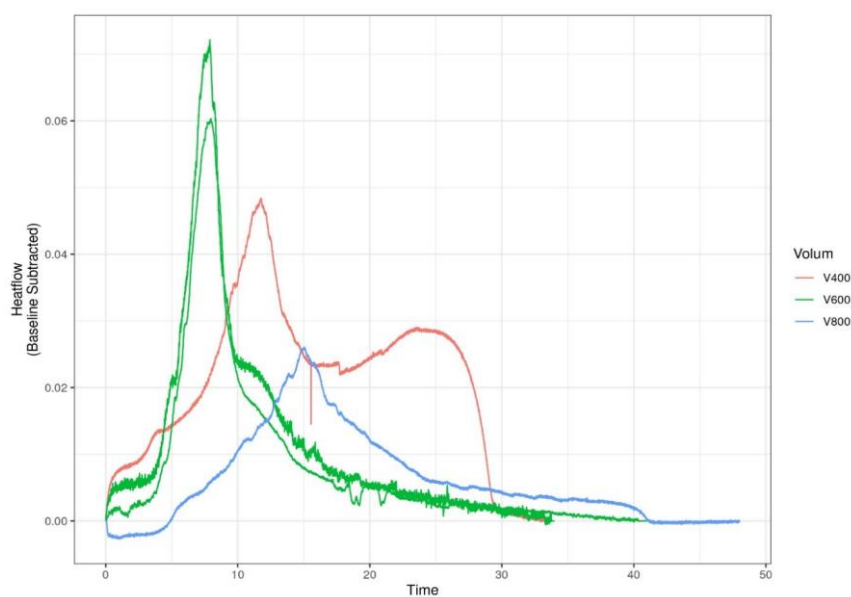


Fig. 2.1. – Reprezentarea grafică a curbelor de creștere generate de căldura degajată de metabolismul activ al *S. aureus*. Experimentele au fost realizate la diferite volume pentru a observa influența mediului asupra dezvoltării bacteriene.

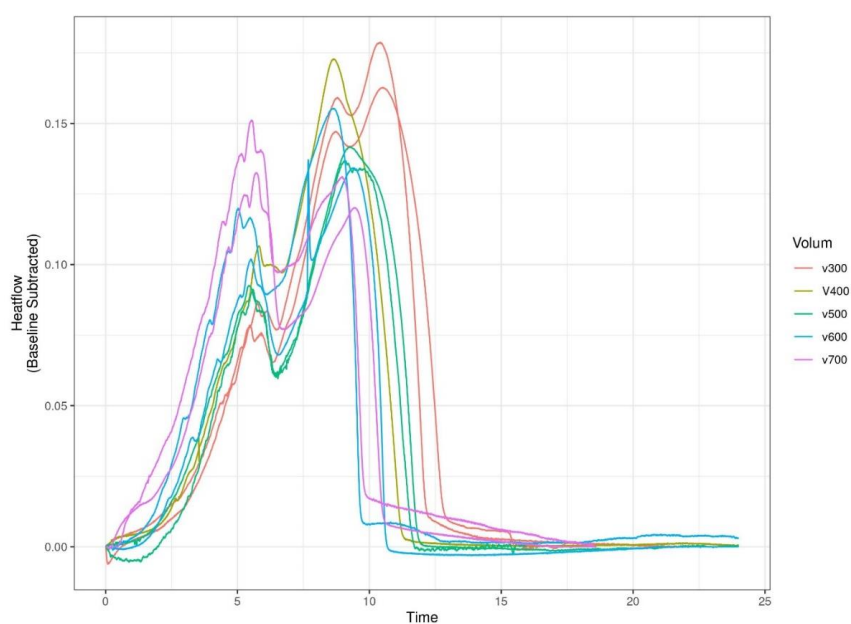


Fig. 2.2. Reprezentarea grafică a curbelor de creștere generate de căldura degajată de metabolismul activ al *E. coli*. Experimentele au fost realizate la diferite volume pentru a observa influența mediului asupra dezvoltării bacteriene, având o reproductibilitate foarte bună

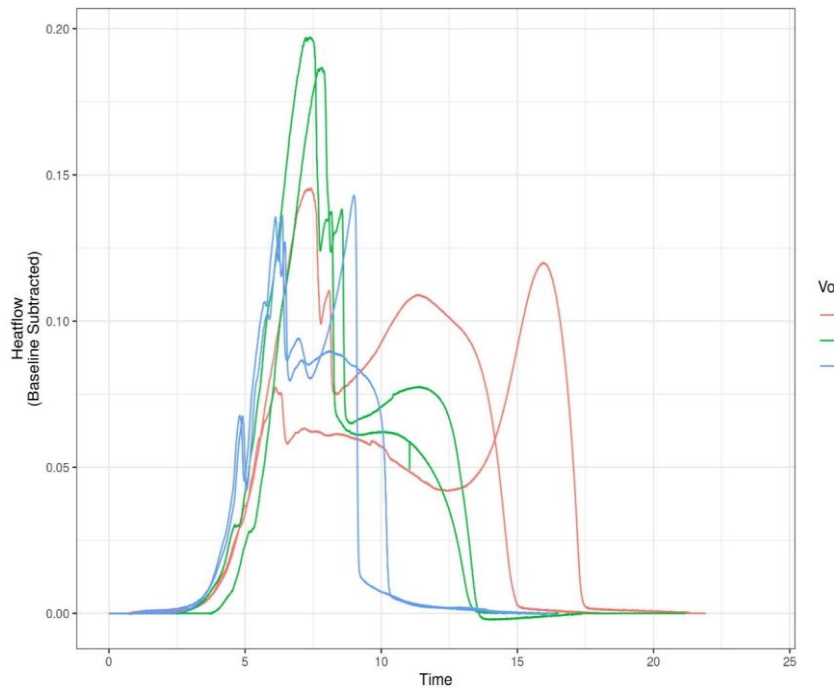


Fig. 2.3. Reprezentarea grafică a curbelor de creștere generate de căldura degajată de metabolismul activ al *K. pneumoniae*.

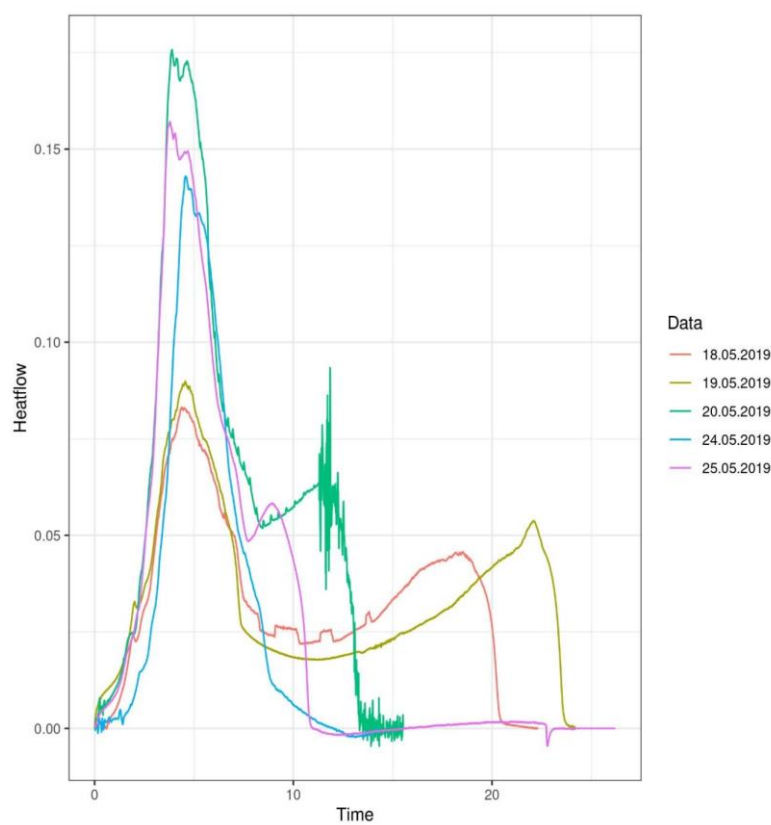


Fig. 2.4. – Reprezentarea grafică a curbelor de creștere generate de căldura degajată de metabolismul activ al *Salmonella spp* în condiții diferite de mediu (MH și TSB).

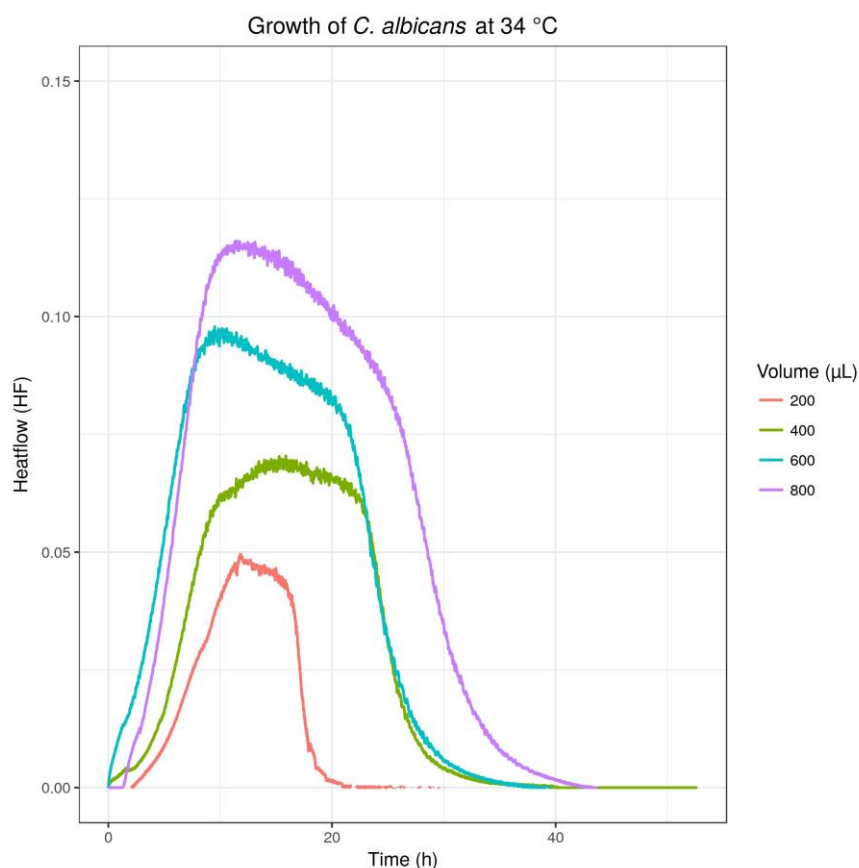


Fig. 2.5. – Reprezentarea grafică a curbelor de creștere generate de căldura degajată de metabolismul activ al *C. albicans*. Experimentele au fost realizate la diferite temperaturi păstrând volumul constant

În graficele prezentate anterior se poate urmări creșterea bacteriană și „amprenta” specifică fiecărei tulpini utilizate pentru experiment (figurile 2.1.-2.5.). Microcalorimetria este o metodă care ne oferă în timp real informații despre experimentul în curs, acestea fiind foarte ușor de accesat de la distanță prin orice dispozitiv conectat la internet. Urmărind graficele putem să observăm cu ușurință că în 10-15 ore de la debutul experimentului în cazul bacteriilor curbele de creștere au ajuns la linia izoelectrică sau mai au foarte puțin de parcurs. Deoarece putem avea acces la datele înregistrate oricând iar timpul de derulare este unul rapid, microcalorimetrie este o metodă mai rapidă în comparație cu multe dintre tehnicile clasice sau mai moderne cunoscute. Urmărind graficele specifice unei tulpini în comparație cu alte tulpini, observăm că acestea sunt diferite, iar atunci când numărul de experimente cu fiecare microorganism este suficient, prin metode de analiză asistată de calculator se poate realiza distincția foarte rapidă între2. tulpini.

2.4. Discuții

Etapele în care este pregătită o probă sunt foarte importante. În primul rând, proba microcalorimetrică trebuie să fie realizată dintr-un mediu însămânțat și incubat proaspăt (12-24 ore) deoarece, în caz contrar, o cantitate importantă din mediu va fi reprezentată de produși de metabolism secundari, fără însemnătate calorică, ce nu contribuie ca substrat de creștere bacteriană, scad pH-ul mediului și reprezintă un mediu „epuizat” nutritiv. Prezența acestor produși influențează indicele McFarland, realizând experimente „în orb”, fără a cunoaște cantitatea de bacterie care se află în interiorul probei. Realizarea unor astfel de studii nu poate să ofere o cale de cercetat pentru că fiecare experiment va fi diferit prin lipsa predictibilității. (25-26)

Cele mai reprezentative au fost experimentele realizate cu *E. coli* datorită numărului mare de volume utilizate și numărului mare de experimente repetate. Putem observa capacitatea microcalorimetriei de a identifica un agent microbian în scurt timp de la debutul unui experiment; chiar dacă volumul introdus în probă a modificat intensitatea și durata, forma curbelor rămâne aceeași în majoritatea experimentelor deoarece fiecare tulpină bacteriană va avea aceeași „amprentă” calorică. (27-28)

2.5. Concluzii

Microcalorimetria, dacă este aplicată urmând un protocol foarte bine stabilit poate să ofere informații interesante și utile asupra metabolismului bacterian.

Se poate folosi în numeroase arii din domeniul medical astfel încât, studiul reprezintă un pas important pentru îmbunătățirea calității actului medical și în diagnosticul infecțiilor.

Pentru a putea utiliza această metodă în clinică sunt necesare numeroase experimente, urmărind impactul a cât mai mulți parametri, pentru a încerca simularea condițiilor clinice. O dată ce suficiente experimente superpozabile sunt cumulate, prin coroborarea acestora se poate realiza un algoritm de lucru cu capacitatea de a oferi informații cu sensibilitate crescută, rapid și putând să fie vizualizate în timp real.

3. Descrierea și evaluarea curbelor de creștere microcalorimetrice a *Candida albicans* în condiții experimentale diferite

3.1. Introducere

Apariția infecțiilor fungice în sfera ortopediei este descrisă rar, fiind caracteristică în cele mai multe cazuri pacienților imunocompromiși care primesc tratament imunosupresor în urma unui transplant de organ, la cei cu infecție HIV, la pacienții sub tratament chimioterapic pentru diverse tipuri de cancer. *Candida albicans* apare cel mai frecvent ca o infecție asociată îngrijirilor medicale la pacienți care au suferit o intervenție chirurgicală sau care au fost internați în secția de terapie intensivă. Fungul poate să realizeze biofilm la nivelul implantelor fiind foarte dificil de tratat în majoritatea cazurilor. Datorită complexității acestor tipuri de infecții și pentru că literatura de specialitate include relativ puține articole legate de studiul microcalorimetric al *C. albicans*, am dorit să realizez un studiu extins asupra modului de creștere în funcție de temperatura la care este incubat și cantitatea de oxigen/nutrienți oferite în diverse condiții experimentale. (29)

3.2. Materiale și metode

3.2.1 Populația fungică

Pentru realizarea experimentelor am folosit o tulpină de *Candida albicans* liofilizată. Pentru dezvoltarea fungică am utilizat mediul Sabouraud atât în formă lichidă cât și în formă solidă, ambele fiind autoclavate înainte de utilizare și testate pentru puritate microbiologică. Cu ajutorul plăcilor cu mediu solid s-a realizat repicarea fungului, obținerea coloniilor izolate și testarea în vederea menținerii purității mediului lichid. Mediul lichid a fost utilizat pentru repicare și pentru pregătirea probelor proaspete necesare experimentelor microcalorimetrice.

3.2.2 Protocol de lucru

Etaple generale de pregătire a probelor microcalorimetrice au fost detaliate în subcapitolul 2.2.1, astfel încât în paragrafele următoare vor fi descrise adaptările specifice necesare experimentelor de față.

Având în vedere că *C. albicans* este singurul fung utilizat pentru realizarea curbelor de creștere microcalorimetrice protocolul de lucru diferă față de cele descrise anterior.

1. Pentru separarea lichidului de solid (masă fungică) s-a realizat centrifugarea la 3.000 rpm timp de 5 minute. Acest proces a fost repetat de 3 ori, cu spălarea cu mediu lichid proaspăt, după fiecare etapă.

2. După obținerea unui concentrat fungic diluat în 200 μ l, creșterea indicelui McFarland a fost realizată la valoarea 0,1 în comparație cu 0,5 cum a fost utilizat în experimentele cu bacterii.

3. Datorită cineticii de creștere mai lente a *C. albicans*, probele microcalorimetrice au fost realizate fără efectuarea unei diluții suplimentare.

3.2.3. Pregătirea probelor microcalorimetrice

Pentru efectuarea experimentelor s-au folosit cele două microcalorimetre cu scanare diferențială (Setaram MicroDSC III and MicroDSC VII). Pentru a observa modelul de creștere fungică în diferite condiții de temperatură, s-au realizat experimente la următoarele temperaturi: 26°C, 30°C, 34°C, 37°C, 40°C. Pentru a vedea cum se dezvoltă microorganismul în funcție de cantitatea de substanțe nutritive și de oxigen s-au realizat experimente cu diferite volume: 200 μ l, 400 μ l, 600 μ l, 800 μ l.

3.3. Rezultate

Pentru studiul propus s-a utilizat aceeași cantitate de agent fungic, aducându-se modificări la volumul utilizat și la temperatura de creștere. Pentru a putea obține date corecte și a observa orice schimbări în *pattern*-ul de creștere fungică, s-au realizat modificări ale câte unui parametru per experiment. În urma realizării acestor experimente s-au identificat modificări specifice ale curbei de creștere microcalorimetrice în funcție de temperatura sau volumul utilizat.

În urma efectuării unor experimente secvențiale cu un volum de 400 μ l la cele 5 temperaturi descrise anterior am putut observa un *pattern* de creștere. Modificarea de temperatură influențează creșterea fungică atât în privința fluxului de căldură maxim cât și a duratei de creștere. Putem să observăm că la 26°C fluxul de căldură este semnificativ mai mic decât în celelalte 4 experimente datorită creșterii fungice lente, această creștere lentă determinând o prelungire a duratei în care fungii pot să se dezvolte prin epuizarea mult mai lentă a resurselor. Începând cu 30°C creșterile se uniformizează însă se poate observa că cele două variabile (durata și fluxul de căldură) cresc progresiv până la 37°C pentru ca apoi să scadă atunci când experimentul este realizat la 40°C. (fig. 3.1.)

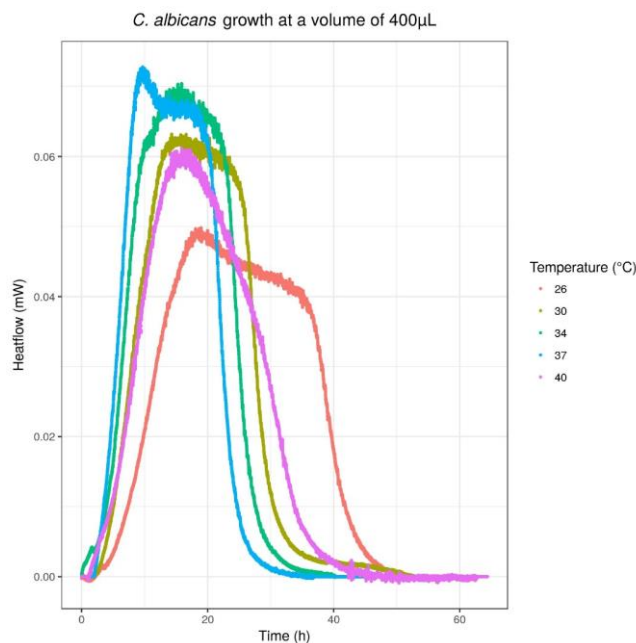


Fig. 3.1. – Curba de creștere microcalorimetrică a *C. albicans*, în funcție de temperatură

Utilizând aceeași cantitate de microorganism, cu același număr de unități formatoare de colonii, am realizat experimente la aceeași temperatură de 34°C modificând volumul introdus în celula microcalorimetrică, începând cu 200 μ l și crescând cu aceeași valoare până la 800 μ l. Curbele descrise de creșterea fungică au demonstrat ipoteza care lua în calcul capacitatea *C. albicans* de a realiza o creștere aerobă facultativ anaerobă, astfel încât se poate observa în imaginea alăturată că energia degajată de creșterea fungică cât și durata în care *C. albicans* se dezvoltă cresc o dată cu creșterea volumului de mediu în care aceasta are mai mult nutrient. (fig. 3.2.)

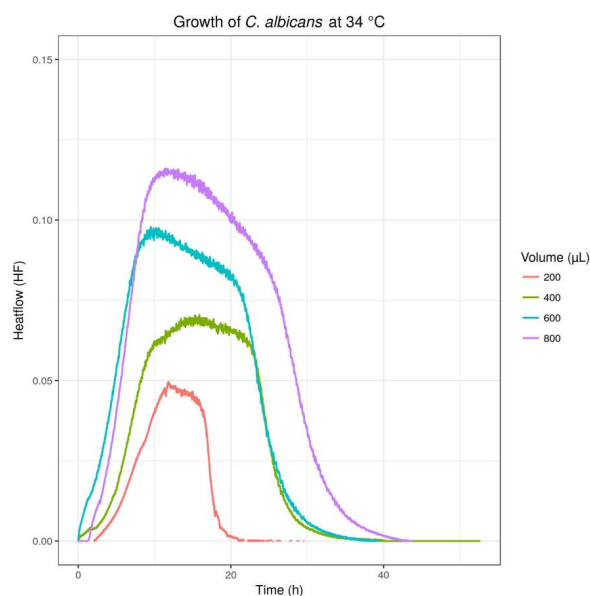


Fig. 3.2. – Curba de creștere microcalorimetrică a *C. albicans* în funcție de volum

Așa cum am putut observa din experimentele microcalorimetrice cu diverse tipuri de bacterii, modificări ale volumului probei și a temperaturii la care se desfășoară experimentul produc schimbări în durata creșterii fungice, în intensitatea căldurii degajate (implicit al fluxului de căldură dintre probă și referință), însă în toate experimentele *pattern*-ul morfologic se păstrează, subliniind capacitatea înregistrărilor microcalorimetrice de a identifica un microorganism după curba de creștere a acestuia. Urmărind curbele de creștere atașate se poate observa o progresie aproape lineară a căldurii degajate în funcție de temperatura de incubare. (fig. 3.3.)

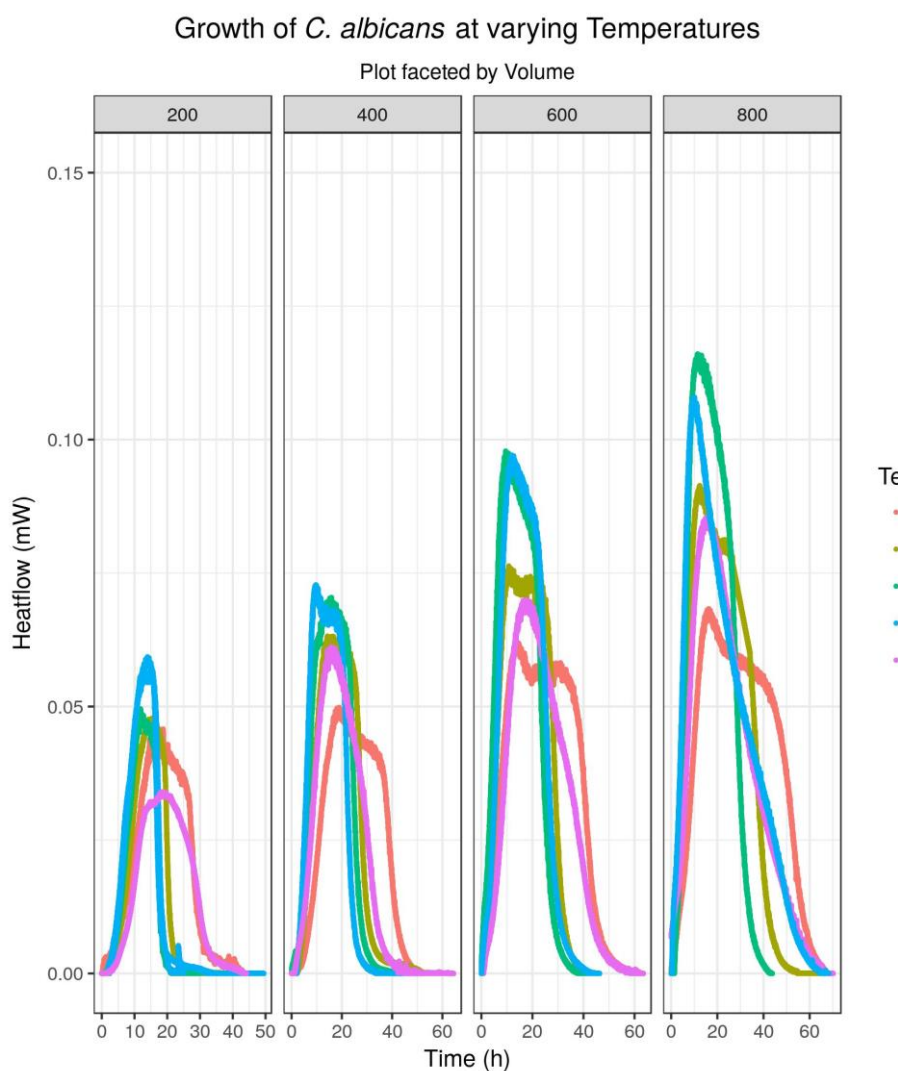


Fig. 3.3.– Reprezentare grafică a curbele de creștere *C. albicans* în funcție de diferite temperaturi și volume

3.4. Discuții

Patologia infecțioasă ortopedică, dificil de tratat, este în creștere datorită numeroaselor microorganisme care dezvoltă rezistență la antibioticele uzuale. În multe dintre cazuri rezistența apare prin administrarea unor clase de antibiotice fără realizarea diagnosticului microbiologic corect (recoltare de produs patologic, testarea corectă și completă și fără adaptarea tratamentului la rezultatele identificării și antibiogramelor). (30) Poate cel mai cunoscut caz de microorganism rezistent la antibiotice este *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA). (31) Un alt exemplu este cel al bacteriilor Gram negative multi-rezistente, unde opțiunile terapeutice devin din ce în ce mai limitate. (32) În momentul de față nu s-au descris foarte multe tulpini de *C. albicans* multi-rezistente, însă un factor determinant al apariției rezistențelor la antibiotice antifungice este timpul lung scurs până la obținerea unei antifungigrame. În cercetarea descrisă, demonstrăm că, utilizând microcalorimetria, există posibilitatea de a identifica acest fung în jumătate din timpul necesar unei identificări microbiologice clasice. În plus, așa cum echipa noastră (33-34) a demonstrat, există posibilitatea realizării unor antifungigrame în timp real cu ajutorul microcalorimetriei.

3.5. Concluzii

Experimentele realizate utilizând *C. albicans* în diferite volume de mediu Sabouraud și la diferite temperaturi au arătat versatilitatea metodei. Aceste studii pot ajuta la optimizarea parametrilor de creștere a tulpinilor de fungi în cazul în care metoda va putea fi utilizată pe scară largă, atât pentru identificare cât și pentru determinarea susceptibilității la antifungice.

4. Studii microcalorimetrice ale interacțiunii dintre *Salmonella spp.* și bacteriofagul specific

4.1. Introducere

În momentul de față apariția agenților microbieni multi-rezistenți reprezintă o problemă gravă de sănătate publică iar comunitatea medicală încearcă dezvoltarea unor metode alternative de tratament. Una dintre aceste metode, care are capacitatea de a distruge bacteriile fără să afecteze gazda, este utilizarea bacteriofagilor. Scopul acestui studiu a fost observarea interacțiunii dintre o bacterie și bacteriofag, prin microcalorimetrie.

4.2. Materiale și metode

4.2.1 Populația bacteriană

Pentru realizarea experimentelor am folosit o specie de *Salmonella* furnizată de Institutul Național de Cercetare „Cantacuzino”. Am realizat subculturi pentru a putea utiliza tulpina în mai multe experimente, pe parcursul pregătirii și studiului doctoral.

Pentru creșterea bacteriană am folosit mediile MH și trypticase soy broth (TSB) atât în formă lichidă cât și în formă solidă, autoclavate înainte de utilizare și testate pentru puritate microbiologică. Cu ajutorul plăcilor cu mediu solid s-a realizat repicarea agentului patogen, obținerea coloniilor izolate și testarea în vederea menținerii purității mediului lichid. Mediul lichid a fost utilizat pentru replicarea agentului patogen și pentru pregătirea probelor proaspete necesare experimentelor microcalorimetrice.

4.2.2 Protocol de lucru

Etapile generale de pregătire a probelor microcalorimetrice au fost detaliate în subcapitolul 2.2.1, astfel încât în paragrafele următoare vor fi descrise modificările specifice necesare experimentelor de față.

Având în vedere că acesta a fost primul experiment utilizând bacteriofagi am consultat literatura de specialitate care conține un număr limitat de publicații legate de studiul microcalorimetric al interacției bacterie-bacteriofag și în concordanță am elaborat următorul protocol:

1. După obținerea unui concentrat bacterian diluat în 200 μ l, am pregătit un inocul standard cu indice McFarland de 0,5. Acesta a fost diluat apoi 1/300.
2. În paralel cu experimentul microcalorimetric, am realizat un experiment de confirmare a activității litice a bacteriofagului utilizând un substrat solid. După însămânțarea „în pânză” a unei plăci cu mediu MH cu *Salmonella* spp., am adăugat volume diferite de mediu cu conținut de bacteriofag pentru a verifica viabilitatea acestuia.

4.3. Rezultate

Experimentele realizate pentru a observa influența asupra creșterii *Salmonella* determinată de diferite concentrații de bacteriofag sunt prezentate în fig. 4.1. În cadranul de imagine în care nu există bacteriofag adăugat se poate observa influența mediului de cultură asupra curbei de creștere bacteriană. Curba de creștere care prezintă un flux de căldură mai mare și un timp de creștere mai scurt este realizată în TSB, un mediu cu capacitate nutritivă superioară MH. Explicația pentru curba descrisă este că bacteriile crescute în TSB se pot dezvolta mai repede având un aport crescut de nutrienți, însă

datorită creșterii mai rapide numărul mai mare de bacterii epuizează într-un timp mai scurt substratul nutritiv, astfel intrând în perioada de inactivitate termică înaintea bacteriilor crescute în mediul MH. Trebuie notat că aceste bacterii sunt într-o stare care nu este echivalentă cu moartea; prin adăugarea de mediu și reîmprospătarea atmosferei la care sunt expuse cu aer acestea și-ar relua creșterea exponențială.

Experimentele cu bacteriofag au fost realizate utilizând mediul de cultură MH. Pentru a avea un control asupra interacțiunii bacterie-bacteriofag, am realizat experimente cu soluție salină fiziologică (SSF), în paralel, suprapunând imaginile cu aceeași cantitate de bacteriofag/SSF pentru a putea observa modificările produse.

Dacă urmărim în dinamică imaginile experimentelor realizate cu SSF putem să observăm că „amprenta” termică a bacteriei nu se modifică semnificativ decât atunci când volumul de SSF îl depășește pe cel al mediului însămânțat în proporție de 6/1 (600 μ L SSF, 100 μ L mediu însămânțat), condiție în care curba de creștere bacteriană prezintă o amplitudine foarte scăzută, datorită limitării în nutrienți.

Interacțiunea dintre bacteriofag și bacterie poate să fie discutată în dinamică. Observăm că o dată cu creșterea progresivă a volumului de bacteriofag adăugat (100 μ L, 200 μ L și 300 μ L), primul vârf (*peak*) de creștere nu este modificat, însă crește progresiv durata de dezvoltare bacteriană, iar al doilea vârf de creștere are intensitate mai mică și este deplasat către dreapta, apărând mai târziu în cursul dezvoltării. În cazul experimentului cu 400 μ L, paradoxal, primul vârf de creștere are o amplitudine mai mare, iar timpul de creștere este foarte scurt în comparație cu celelalte înregistrări. În ultimul experiment, asemănător cu cel realizat cu SSF, creșterea bacteriană este puternic inhibată, fluxul de căldură având valori scăzute pe tot parcursul înregistrării.

Crestere Salmonella cu volume progresiv crescatoare de bacteriofag.
Volum final proba 700 uL

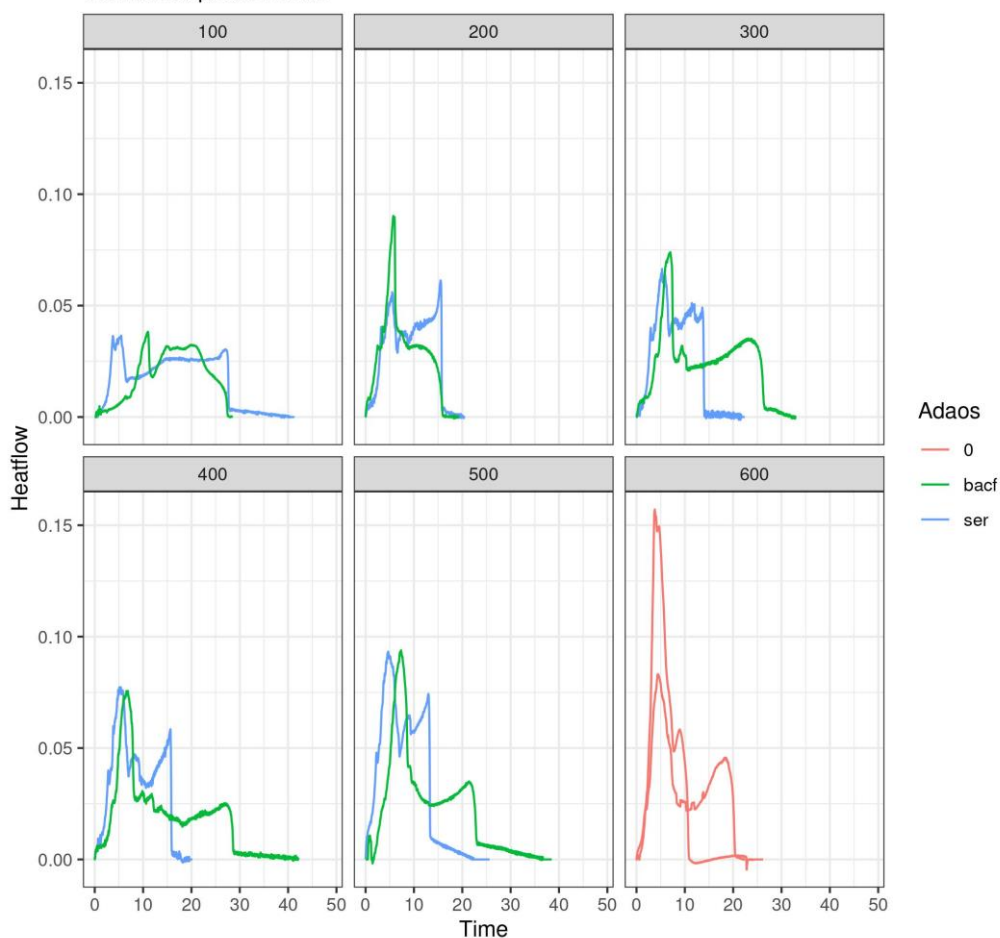


Fig. 4.1. – Creșterea bacteriană în prezența a cantități diferite de bacteriofag

În urma interpretării datelor prezentate, punând accent pe reprezentarea grafică în funcție de căldura totală degajată (aspect obținut prin integrarea fluxului de căldură instantaneu pe toată durata înregistrării) putem să observăm în fig. 4.2. că, așa cum am discutat anterior, datorită unei prezențe insuficiente de bacteriofag acesta lizează un număr insuficient de bacterii pentru a opri creșterea bacteriană în primă fază, oferind posibilitatea populației bacteriene să se dezvolte.

Așa cum este mai ușor de observat în cazul figurii 4.2., modificarea cineticii de creștere apare în special în a doua jumătate a curbei de creștere bacteriană. Astfel, creșterea bacteriană este, în mod specific întârziată după aproximativ 10 ore de creștere.

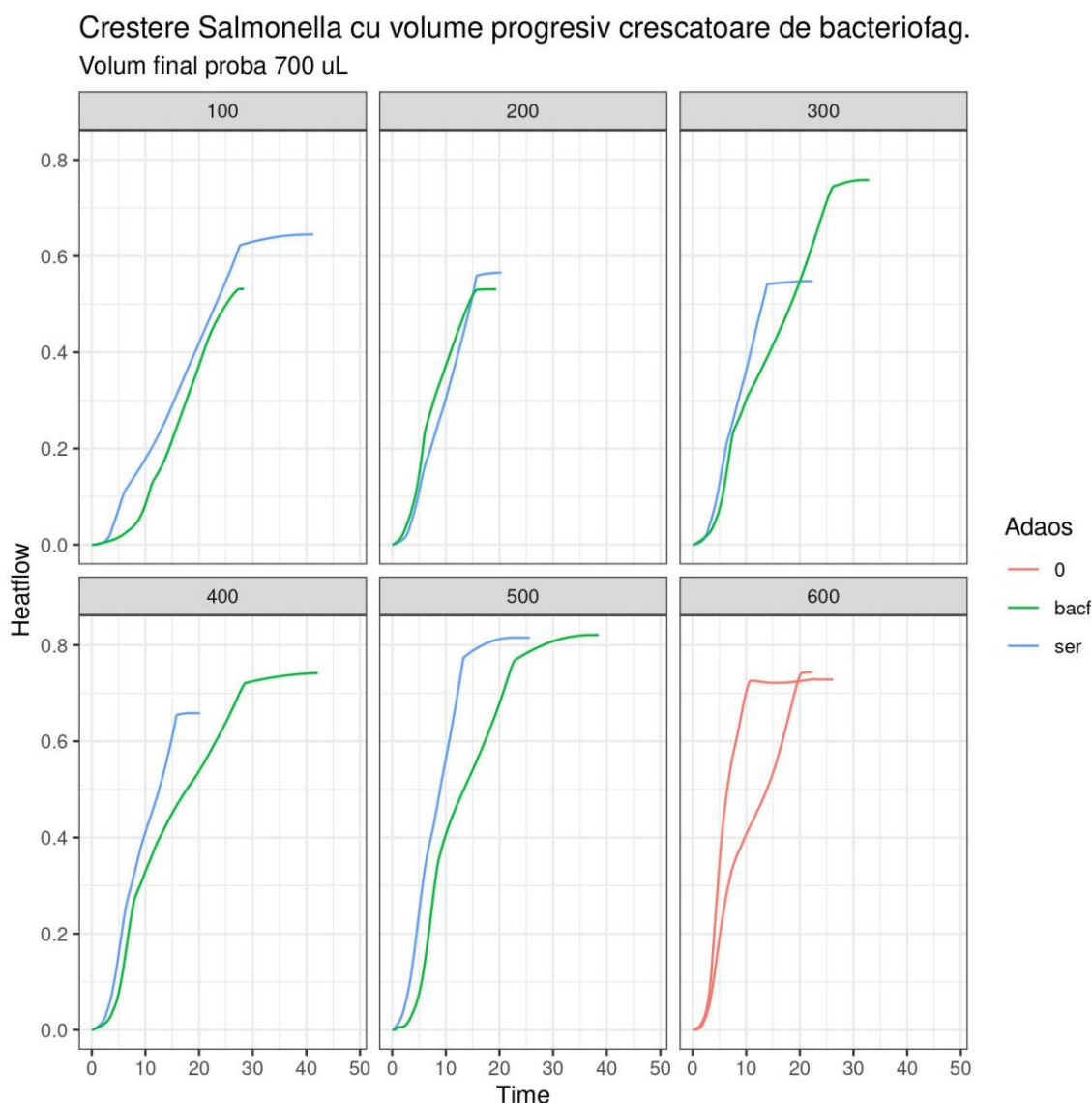


Fig. 4.2 – Creșterea bacteriană în prezența a cantități diferite de bacteriofag.

Investigarea parametrilor cinetici ai creșterii bacteriene a fost realizată utilizând un model matematic de creștere bacteriană, modelul Richards. În figurile 4.3. și 4.4. putem să observăm reprezentarea grafică a curbelor de creștere, comparativ cu cel mai bun model de creștere ce a putut fi suprapus peste rezultate (proces cu denumirea de „*fitting*”). Numărul inițial de bacterii este reprezentat de variabila „ y_0 ”, însă această valoare minimă de bacterie este o valoare pe care algoritmul o calculează, nefiind echivalentă cu numărul de celule formatoare de colonii per mililitru (discordanță între parametrul y_0 și valoarea microbiologică a numărului de bacterii însămânțat). Rata maximă de creștere a bacteriei este calculată de algoritmul și reprezentată prin parametrul „ μ_{max} ”, aceasta valoare dând panta de creștere bacteriană. „ K ” reprezintă capacitatea mediului de susținere bacteriană și

este un parametru ce caracterizează mediul de cultură. Parametrul „beta” este un factor modulator al formei graficului.

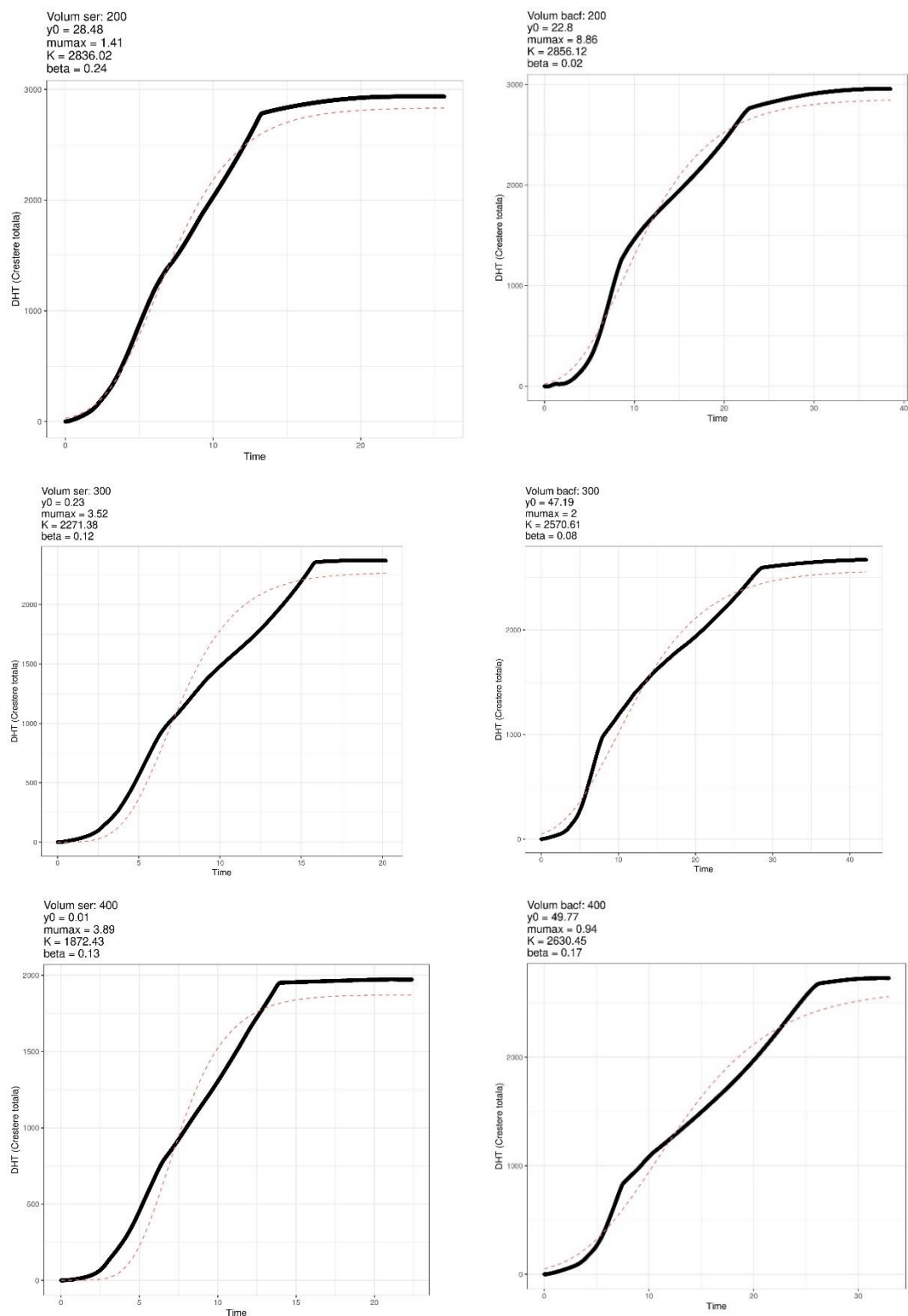


Fig.4.3. — Reprezentare grafică a curbei microcalorimetrice utilizând modelul de creștere Richards

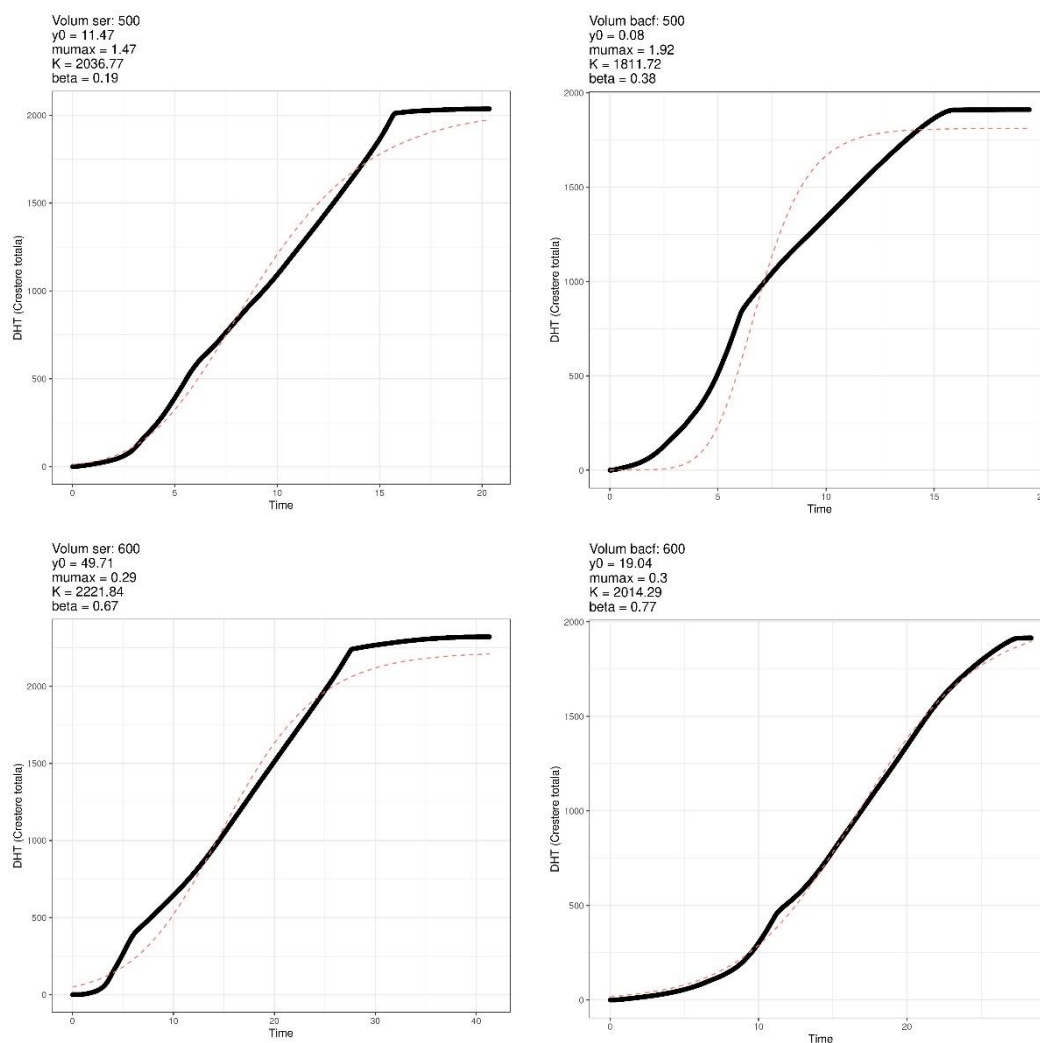


Fig. 4.4. – Reprezentare grafică a curbei microcalorimetrice utilizând modelul de creștere Richards

4.4. Discuții

Capacitatea bacteriilor de a dezvolta rezistență la antibiotice este o problemă de sănătate publică care necesită rezolvare pentru că emergența tulpinilor multi-rezistente reprezintă un risc care va crește morbiditatea și mortalitatea la nivel global în cazul acestor patologii. În cazul infecțiilor ortopedice dezvoltarea de către bacterie a unui biofilm care îi conferă rezistență la tratamentul inițiat este o problemă reală. În diferite studii s-a arătat eficiența bacteriofagilor în distrugerea bacteriilor care sunt aderente la implante prin intermediul biofilmului. (35-36)

Utilitatea microcalorimetriei în descrierea interacțiunii dintre bacterie și bacteriofag este o temă de cercetare care nu a fost studiată în profunzime, numărul de articole analizând această temă este relativ restrâns. Lucrarea realizată de Tkhilaishvili et al. combină studiul microcalorimetric al interacțiunii bacterie-bacteriofag cu posibilitatea

acestei metode de a studia liza produsă de bacteriofag asupra biofilmului bacterian dezvoltat de *E. coli*. În cadrul aceluiași studiu s-a urmărit capacitatea de interacțiune a bacteriofagului cu *E. coli* în stare planktonică și în cadrul biofilmului. (37) O altă lucrare realizată de Tkhilashvili et al. studiază capacitatea bacteriofagului Sb-1 de a potența tratamentul antibiotic standard în liza biofilmului bacterian produs de *S. aureus*. (38) În urma studierii literaturii de specialitate, aceste două articole sunt cele mai complexe realizate în domeniu.

Din ambele studii a reieșit faptul că liza produsă de bacteriofag este direct dependentă de cantitatea acestuia, însă doar în combinația cu substanțe antibiotice s-a reușit liza completă a microorganismelor. Bacteriofagii fiind virusuri, au nevoie de o bacterie gazdă pentru replicare, numărul lor crescând exponențial față de titrul introdus inițial. Luând în considerare modelul de creștere al acestora se poate trage concluzia că un timp mai lung de expunere ar putea să ofere o liză completă a bacteriilor studiate. (37-38)

Studiul de față are anumite limitări. În primul rând, fiind primul astfel de studiu realizat, protocolul de lucru nu a putut fi dus la perfecțiune. Nu s-a realizat o titrare exactă a bacteriofagului (realizabil prin numărătoarea unităților formatoare de plăci de liză) ci doar experimente succesive cu o cantitate crescândă a mediului conținând bacteriofag astfel încât nu se poate preciza cu exactitate numărul de unități formatoare de plaje prezente în soluția de bacteriofag utilizată. S-au lucrat experimente cu volume progresiv mai mici de mediu inoculat cu bacterie însă inoculul a rămas același, astfel încât o dată cu scăderea volumului de mediu inoculat introdus în experiment a scăzut și numărul de unități formatoare de colonii bacteriene prezente într-un volum mai mic.

Punctele forte ale studiului sunt descrierea în paralel a interacțiunii bacteriofag-bacterie cu adăugarea de SSF pentru a observa modificări de activitate în aceeași cantitate de lichid. Studiul de față reprezintă prima cercetare cu ajutorul microcalorimetriei din România, legată de interacțiunea bacteriofag-bacterie.

Am demonstrat că în modul de acțiune al bacteriofagului asupra culturii de *Salmonella* aflată în condițiile de creștere ce pot fi asigurate de microcalorimetrul folosit se ajunge la alterarea curbei de creștere în a doua jumătate a înregistrării. Acest lucru poate fi datorat faptului că în cursul primei părți a înregistrării are loc o îmbogățire cu bacteriofag ce se multiplică concomitent cu creșterea bacteriană. Așa cum am demonstrat în cadrul unui articol publicat anterior, cel de-al doilea vârf reprezintă creșterea microorganismelor aflate la interfața lichid-aer. (39) Astfel, este vorba despre un număr relativ mic de microorganisme care se dezvoltă în această a doua fază, asociată îmbogățirii

bacteriofagului. Așa cum este evidențiată prin parametrul „K” al modelului Richards, creșterea totală bacteriană în cazul adărierii de bacteriofag, la volume peste 300 μ L este constant mai mică, demonstrând efectul litic al acestuia asupra culturii bacteriene.

4.5. Concluzii

Posibilitatea investigării interacțiunii dintre bacteriofag și bacterie a fost studiată cu succes atât în literatura de specialitate cât și în studiul de față. Studiul deschide o serie de posibilități, pornind de la această investigație în premieră, în România. Astfel, se poate extinde capacitatea Laboratorului de Biocalorimetrie pentru optimizarea dezvoltării și cuantificării de bacteriofag și efectuarea de studii ce folosesc atât bacteriofag cât și alte substanțe cu activitate antibacteriană (antibiotice clasice sau compuși investigaționali).

Informațiile legate de capacitatea unei cantități crescânde de bacteriofag de a produce liza unei bacterii studiate a fost prezentată în studiul de față, datele obținute fiind în conformitate cu studii publicate.

Este necesară elaborarea unui protocol de lucru complex pentru a reuși caracterizarea și mai performantă a acestei interacțiuni, foarte interesantă, cu mare potențial, ceea ce îmi propun pentru viitorul apropiat sau mediu.

5. Elaborarea unor curbe microcalorimetrice de creștere bacteriană utilizând agenți microbieni prelevați din focare de infecție în sistemul musculo-scheletal

5.1. Introducere

Așa cum am arătat în subcapitolele anterioare în care am utilizat diferite microorganisme standard, microcalorimetria prezintă un real interes pentru studierea curbelor de creștere ale acestora. Fiecare dintre microorganismele studiate au dezvoltat „amprente” termice diferite în funcție de gen bacterian și specie, fiind în același timp superpozabile în cadrul aceleiași tulpini și aceeași specie. În studiul următor, bazat pe recoltarea de agenți microbieni de la pacienții cu infecții în sfera ortopediei, am evaluat dacă aceste tulpini dezvoltă aceleași caracteristici.

5.2. Materiale și metode

Fiind rezident pe secția de ortopedie și traumatologie a SUUB, sub coordonarea Prof. Univ. Dr. Cătălin Cîrstoiu, am putut, prin bunăvoința domnului profesor, să particip și să recoltez produs patologic pentru experimente de la 16 pacienți.

Produsul patologic a fost identificat utilizând 3 metode de diagnostic. Prima metodă a fost reprezentată de identificarea microbiologică clasică. A doua metodă a fost *Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS). A 3-a metodă a fost evaluarea curbelor de creștere generate cu ajutorul microcalorimetriei.

5.2.1 Protocol de lucru

Având în vedere că acesta a fost primul experiment utilizând produs patologic extras de la pacienți cu infecții în sfera musculo-scheletală, am încercat să aplic protocolul general pentru toate experimentele, pentru a nu modifica variabile care ar putea perturba.

Toate experimentele au fost realizate la aceeași temperatură (37° C), același volum (600 µl) și cu același mediu (MH), pentru a diminua pe cât posibil numărul de variabile. Întrucât s-a dorit identificarea unei metode care să ofere informații cât mai rapide asupra creșterii bacteriene, s-au folosit multiple diluții ale microorganismului investigat.

MALDI-TOF-MS este o metodă nouă, ce a condus la un diagnostic microbiologic rapid, în baza unei „amprente” proteomice a diferitelor bacterii. Metoda implică etalarea microorganismului (colonie izolată) pe o „placă țintă” MALDI-TOF-MS, adăugarea unei matrici și introducerea probei în sistem. În baza unei „electroforeze” în vid a proteinelor bacteriene ce sublimează în urma folosirii unui laser de înaltă capacitate, aparatul obține un spectru bazat pe raportul masă/încărcătură electrică a proteinelor și intensitatea (abundența relativă) a acestora. Aceste elemente sunt interpretate prin compararea lor cu o bază de date oferită de producătorul aparatului sau de instituții de specialitate (ex. CDC, Atlanta, GA) pentru identificarea speciilor microbiene.

5.3. Rezultate

Atunci când utilizăm microcalorimetria cu un singur canal pentru asigurarea relevanței statistice, respectarea protocolului și obținerea reproductibilității - este esențială. În precedentele capitolele am arătat capacitatea realizării unor experimente superpozabile. O parte dintre tipurile de experimente realizate în cursul studiului doctoral au fost realizate pentru prima dată în țara noastră, fiind elemente de pură cercetare; pentru a putea progresa este necesar un fundament cât mai stabil.

S-a încercat standardizarea modelului de lucru; toți parametrii au fost identici, indiferent de agentul microbial studiat. Singurele modificări introduse au fost în cazul *S.*

aureus pentru că, fiind întâlnit în probe recoltate de la mai mulți pacienți, a fost posibilă realizarea mai multor experimente precum și aprofundarea studierii acestui microorganism.

În figura nr. 5.1. sunt expuse toate experimentele realizate utilizând bacterii recoltate de la pacienți. Figura permite să observăm reproductibilitatea metodei, curbele de creștere fiind superpozabile. Privind în ansamblu, diferențele în cazul fiecărei tulpini nu sunt foarte bine vizibile. Din această cauză am introdus fig. 5.2. pentru a demonstra importanța interpretării datelor la o scară corectă. Încercarea de a diferenția două tulpini bacteriene fără o prelucrare inițială a curbelor de creștere reprezintă o eroare; datele trebuie înțelese și interpretate în context. O dată ce o tulpină a fost supusă experimentelor repetate, în aceleași condiții, aceasta poate fi ușor identificată atunci când respectăm cu strictețe protocolul.

Prin suprapunerea curbelor de creștere, în fig. 5.3. putem să observăm „amprenta” termică distinctă a fiecărei tulpini, fiecare dintre acestea având o „morfologie” caracteristică. În graficele expuse în fig. 5.4. se observă modelul de creștere pentru *S. aureus* la diferite diluții. Se poate observa că „morfologia” curbei este foarte asemănătoare între experimente; modificările apar, așa cum era de așteptat, în funcție de intensitatea căldurii degajate și timpul necesar pentru creștere și multiplicare.

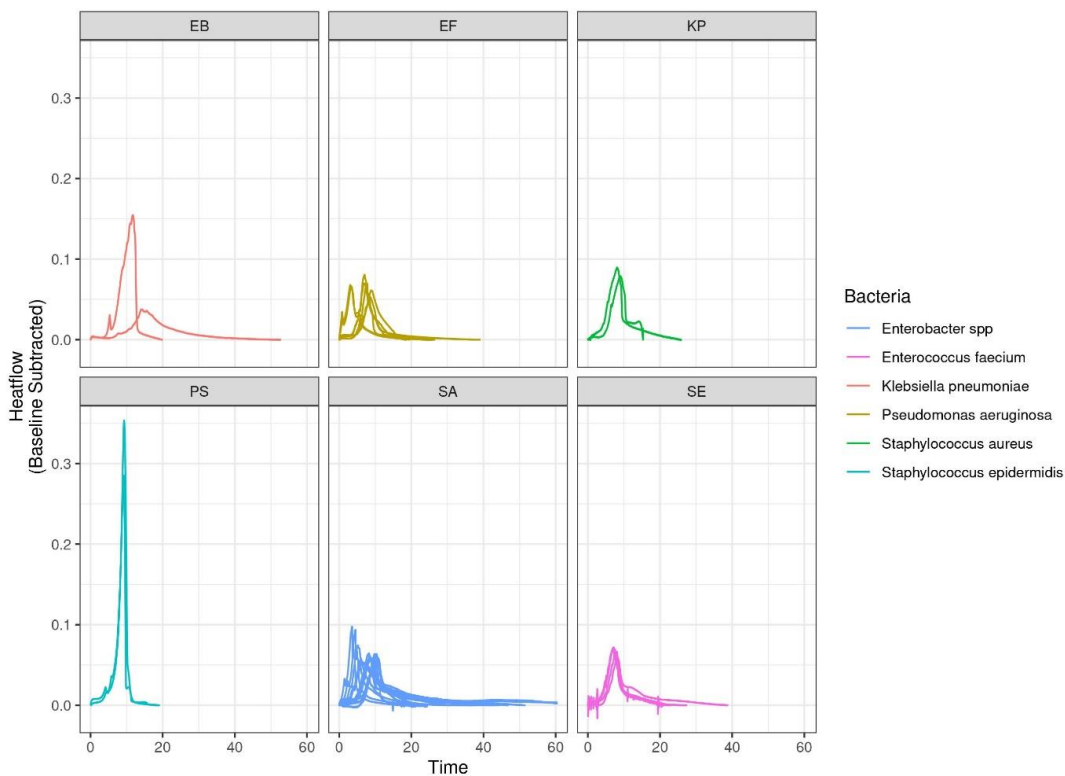


Fig. 5.1. – Reprezentare grafică a tuturor experimentelor realizate cu tulpini extrase de la nivelul unui proces septic musculo-scheletal

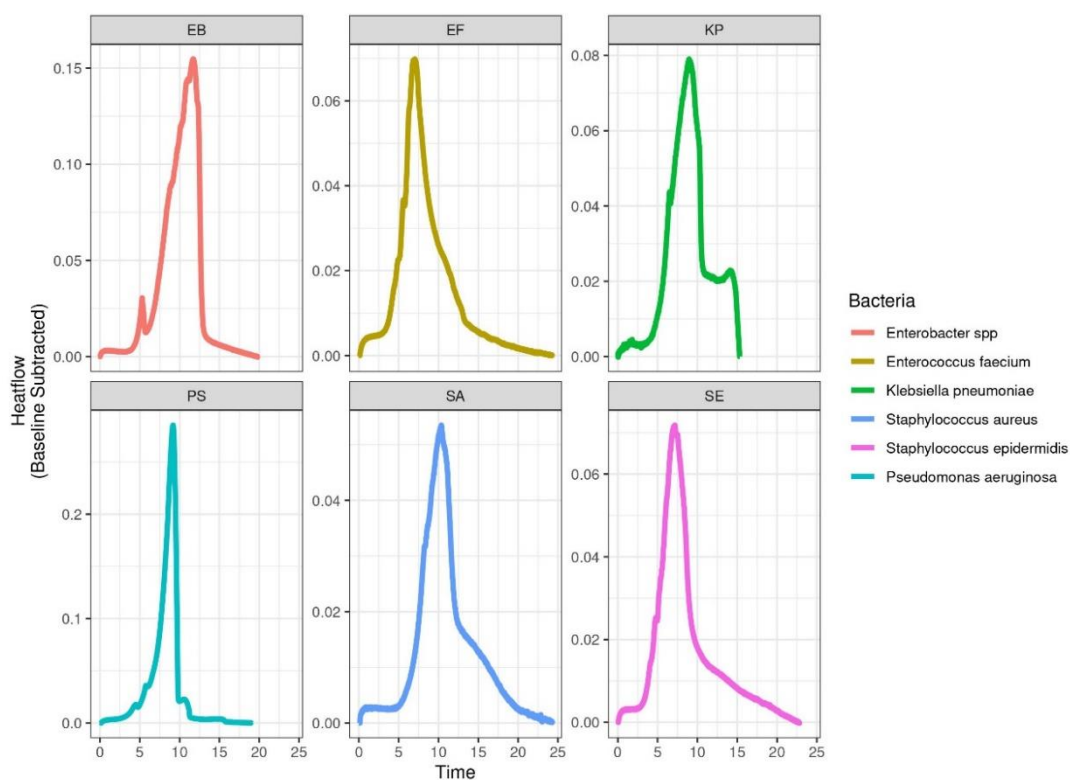


Fig. 5.2. – Reprezentare grafică individuală pentru fiecare dintre microorganisme.

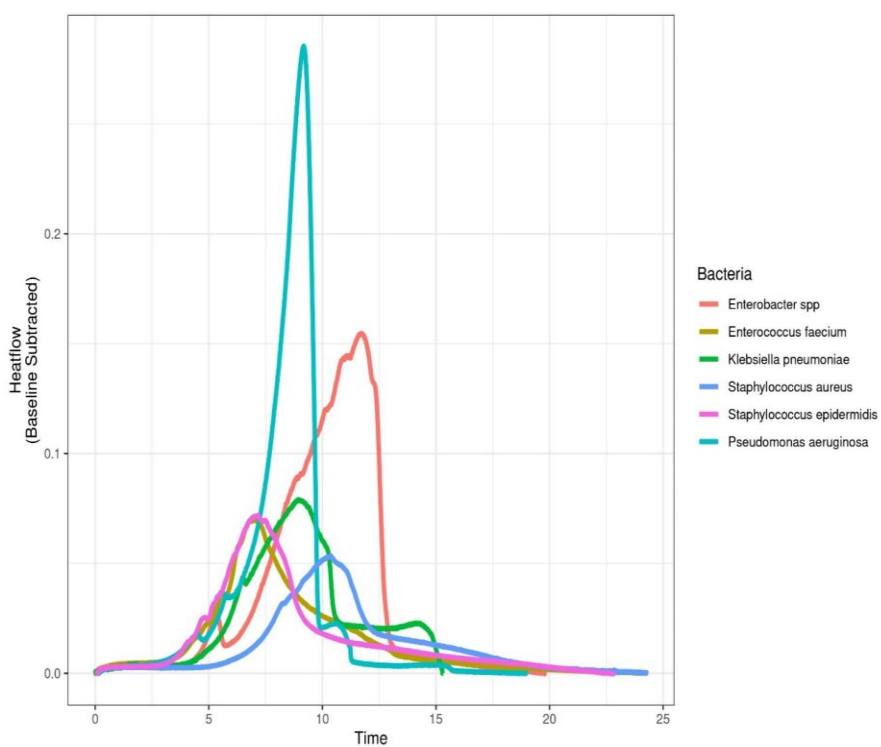


Fig. 5.3. – Reprezentare grafică a curbelor de creștere ale microorganismelor studiate și prezentate în fig. 5.2. , grupate în același grafic - pentru a facilita observarea diferențelor de „amprentă” termică.

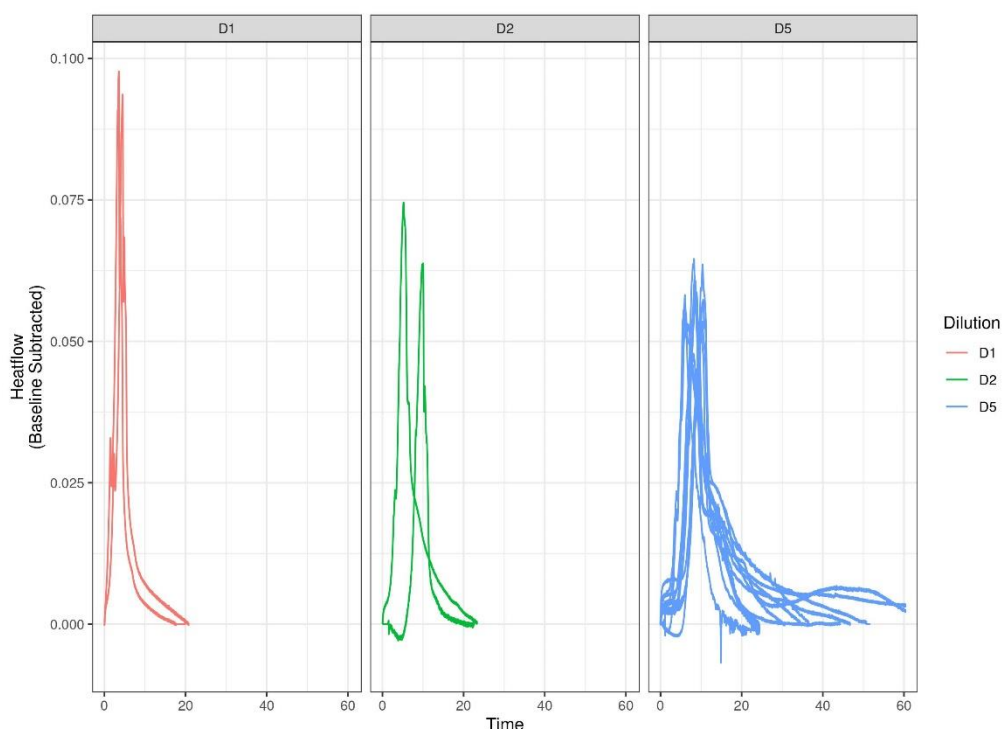


Fig. 5.4. - Reprezentare grafică a tuturor experimentelor realizate cu *S. aureus*.

Având în vedere că discutăm despre cel mai frecvent microorganism identificat în infecțiile ortopedice, am realizat experimente în mai multe diluții pentru a exprima mai bine modelul de formare al curbelor de creștere

5.4. Discuții

Utilizarea MALDI-TOF-MS a intrat în practica microbiologică. Tehnica prezintă, ca avantaj major, identificarea unui microorganism în doar câteva minute:

- timp efectiv de lucru al sistemului (laserului) per probă: 15 secunde
- timp de procesare a datelor per probă: maxim 30 secunde
- timp de lucru agregat pentru o probă (pregătirea unei probe, încărcarea țintei, pregătirea laserului și timpul de operare): maxim 5 minute

Tehnica oferă și o serie de alte avantaje:

- costul per probă (neluând în calcul investiția inițială în sistem) este mic
- lucrul efectiv este relativ facil, putând fi executată de tehnicieni (bine instruiți)
- aparatul oferă un scor de fiabilitate care orientează diagnosticul la nivel de gen și specie.

Totuși, sunt recunoscute și câteva limite ale metodei. Este necesară o bază de date extinsă, bine caracterizată, ce poate conduce la discriminarea între diversele tipuri bacteriene. Unele genuri / specii cu care se operează foarte ușor în microbiologia clasică sunt foarte similare în baza „amprentei” proteomice investigate prin MALDI-TOF, astfel

încât discriminarea este puțin fiabilă (de exemplu, genurile *Escherichia* – *Shigella*, speciile din cadrul complexului *Enterobacter cloacae*). Este de menționat și că tehnica nu este una „dinamică”, oferind un rezultat doar în baza microorganismului care a fost etalat pe placa ținută și nu oferă date fenotipice despre acesta.

Punctul central al studiului doctoral implică alegerea unei metode de diagnostic care să poată identifica și oferi informații, corecte, fiabile, în timp scurt, cu privire la agentul patogen implicat în infecțiile ortopedice. Microcalorimetria, este o metodă cu bun potențial. (40-45)

Așa cum se poate observa din acest capitol sau cum s-a arătat în cele precedente, variația de volum și de diluție a probei nu modifică, în principiu, „morfologia” clasică a curbelor pentru un microorganism; există diferențe legate de intensitatea puterii calorice înregistrate și de timpul în care se dezvoltă bacteria. Pentru a realiza experimente corecte și utile, este recomandată efectuarea tuturor înregistrărilor utilizând aceeași parametri pentru fiecare bacterie studiată.

Urmărind curbele de creștere ale celor 6 bacterii studiate am observat că fiecare prezintă cantitativ și calitativ „amprente” termice diferite, iar prin standardizarea experimentelor și a protocolului de lucru, timpul în care este posibilă diferențierea scade.

Condițiile de mediu la care sunt supuse bacteriile în momentul înregistrării pot să modifice curba de creștere. Mediul de cultură utilizat, printr-o concentrație mai mare sau mai mică de nutrient, va influența capacitatea bacteriană de dezvoltare și implicit energia produsă. Atunci când este utilizat un mediu îmbogățit și timpul de creștere este influențat deoarece printr-o creștere bacteriană mult mai rapidă elementele nutritive sunt consumate într-un timp mai scurt și populația bacteriană își încetinește metabolismul. Volumul de oxigen este un alt factor important în evoluția experimentului; atunci când volumul probei este scăzut, volumul de oxigen este crescut și bacteriile se pot dezvolta mai rapid. Limitele studiului, din start, includ faptul că utilizarea unor produse patologice (și nu tulpini izolate în cultură), reprezintă o necunoscută inițial dificil de abordat. Fiind în studiu un produs patologic nu este posibil să se facă o apreciere cantitativă privind bacteria implicată; în cazul în care este o infecție concomitentă cu 2 sau mai multe microorganisme, dificultatea este sporită. Atunci când microorganismele au fost izolate în cultură pură (colonii izolate) și studiul microcalorimetric utilizează germenii din colonie, aspectul curbelor este caracteristic, dar timpul de obținere este mai îndelungat (ex. pentru o bacterie cu ritm de diviziune 20-30 minute, cultura se obține în 18-24 de ore și abia apoi poate începe studiul microcalorimetric). Ne propunem ca în perioada următoare să realizăm experimente

pornind de la produse patologice, pentru a pune la punct un protocol de lucru și pentru a estima nivelul de precizie care ar putea fi atins.

O altă limită a studiului este numărul relativ mic de bacterii diferite utilizate. Se poate ridica ipoteza că în urma utilizării unui număr mai mare de bacterii diferite, ar putea să apară pentru anumite tulpini modificări ale „amprenteii” termice. Până acum nu am identificat astfel de tulpini.

5.5. Concluzii

Necesitatea apariției unor noi metode este esențială deoarece identificarea tardivă sau incorectă a unei tulpini microbiene poate conduce la un tratament incorect cu repercusiuni asupra pacientului, familiei, societății, sistemului medical, inclusiv prin facilitarea selecționării de bacterii rezistente sau multi-rezistente.

Microcalorimetria reprezintă o metodă recomandabilă deoarece conduce la obținerea unor rezultate rapide, cu o sensibilitate crescută.

Pentru a deveni o metodă de diagnostic, cu importanță practică în medicina curativă, este necesară continuarea studiilor (eventual în cadrul unui proiect post-doctoral) și punerea la punct a unui protocol de lucru care să poată să fie utilizat de orice altă echipă, în condiții similare și cu rezultate reproductibile.

Tandemul Microcalorimetrie - MALDIT-TOF-MS poate reprezenta o variantă interesantă și utilă, cu foarte bun potențial.

Studiul doctoral a demonstrat ca microbii recoltați de la nivelul unor procese septicice sunt foarte asemănători (microcalorimetric) cu microorganismele liofilizate, ceea ce ridică ipoteze pentru viitoare direcții de cercetare.

6. Utilizarea sonicării implantelor infectate pentru dezangrenarea celulelor bacteriene combinată cu diagnosticul utilizând tehnici de biologie moleculară

6.1. Introducere

Conform datelor din literatura de specialitate, combinarea sonicării implantelor cu amplificarea genetică (prin tehnica PCR) reprezintă o strategie recomandată pentru creșterea specificității și sensibilității rezultatelor. Unul dintre obiectivele studiului doctoral a fost utilizarea experimentală în vederea introducerii în practică a acestei recomandări.

6.2. Materiale și metode

În cadrul acestui studiu s-au utilizat 3 implante infectate, extrase de la pacienți internați în secția de ortopedie și traumatologie a SUUB. Materialele recoltate au fost sonicate și ulterior s-a utilizat amplificarea genetică (PCR) în tehnica multiplex PCR.

6.2.1 Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene

Prelevarea s-a realizat cu un tampon steril umectat în SSF, ștergându-se întreaga suprafață a protezei. Suspensia obținută în SSF a fost centrifugată (4.000 rpm, 10 min), sedimentul obținut, precum și țesutul recoltat de pe proba 1 și 3 au fost păstrate la -70° C. Tamponul a fost descărcat pe plăci Petri cu geloză sânge și pe plăci Petri cu mediul Sabouraud, dar și în mediu lichid - bulion simplu. Incubarea s-a realizat timp 24 ore la 37° C (respectiv la 28°C pentru eventualii fungi, pe mediul Sabouraud). După 24 ore, din bulion a fost însămânțată o placă cu geloză sânge și una cu Sabouraud, plăci incubate în aceleași condiții menționate mai sus.

6.3. Rezultate

Tulpinile prelevate (din cele 3 implante, notate P1, P2, P3) au fost identificate prin MALDI-TOF ca fiind P1- *Staphylococcus epidermidis*, P2- *Staphylococcus aureus*, P3- *Staphylococcus aureus*. La nivel molecular, probele P2 și P3 au fost pozitive pentru gena *nuc*, confirmându-se astfel tulpinile respective ca fiind *S. aureus*.

Rezultatele au arătat că toate tulpinile izolate au fost rezistente la unele antibioticele beta-lactamice (penicilină și ceftarolină). Se remarcă tulpina de *S. epidermidis* care pe lângă rezistența la beta-lactamice a fost rezistentă și la tetraciclină și la macrolidele testate (azitromicină și eritromicină) (tabel VI.1, figura 6.1.).

Tabel VI.1. *Pattern*-ul de sensibilitate al tulpinilor analizate

	P	FOX	CPT	CIP	STX	RIF
<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	S	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	R	S	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	R	S	S	S

	CN	AZM	E	DA	TE	LZD
<i>S. epidermidis</i>	S	R	R	S	R	S
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S

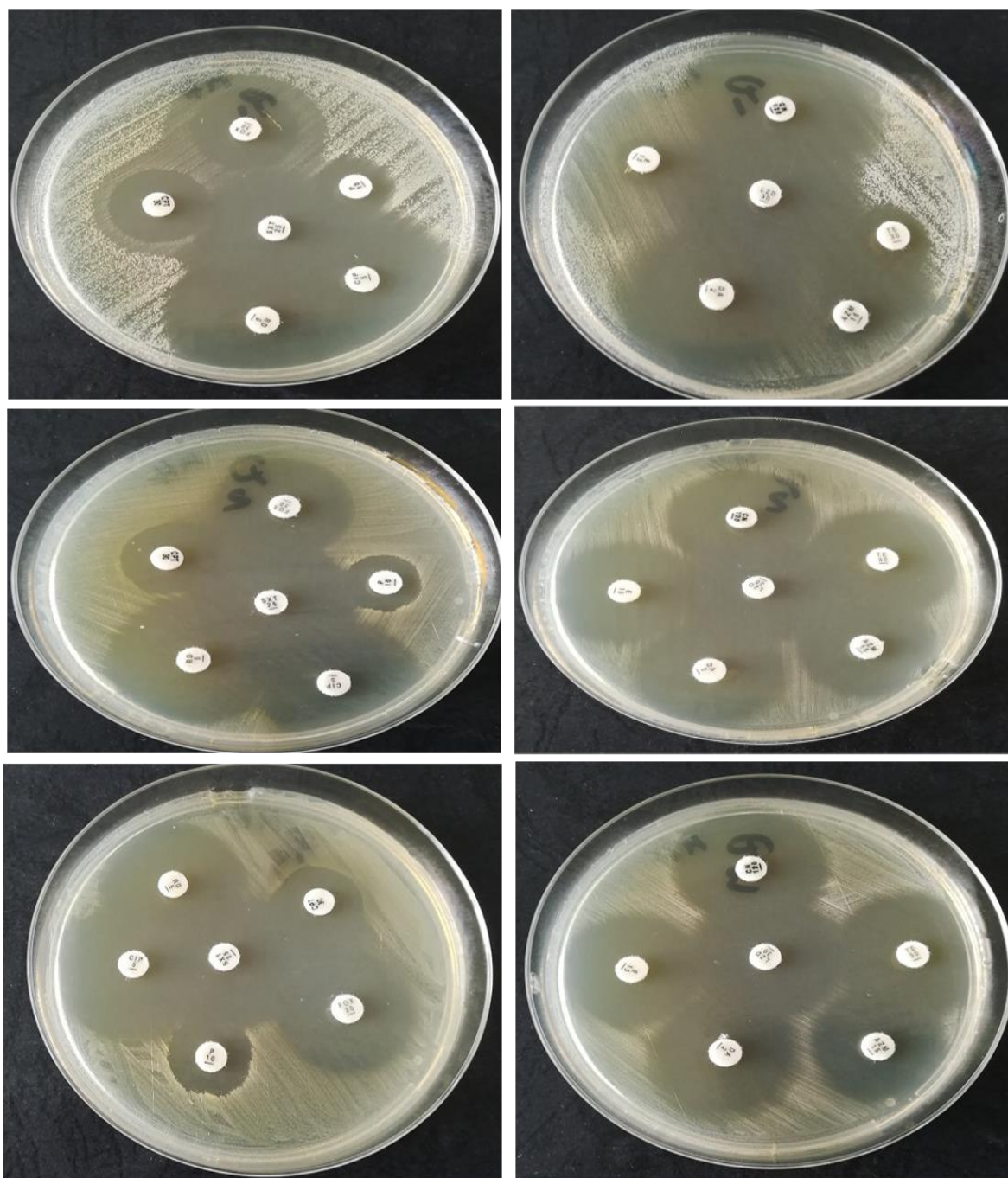


Figura 6.1. Antibiograma tulpinilor analizate P1- *S. epidermidis*, P2- *S. aureus*, P3- *S. aureus*

Rezultatele au fost confirmate și la nivel molecular, *S. epidermidis* (P1) fiind pozitiv pentru gena *mecA*. (fig 6.2.)

Toate tulpinile analizate au fost pozitive pentru gena *blaZ*, care conferă rezistență la antibioticele beta lactamice. Tulpina de *S. epidermidis* rezistentă fenotipic la tetraciclină a fost pozitivă pentru gena *tetM*. Rezistența la macrolide nu s-a confirmat la nivel molecular, tulpina respectivă fiind negativă pentru genele *ermA* și *ermC*. (fig. 6.3.)

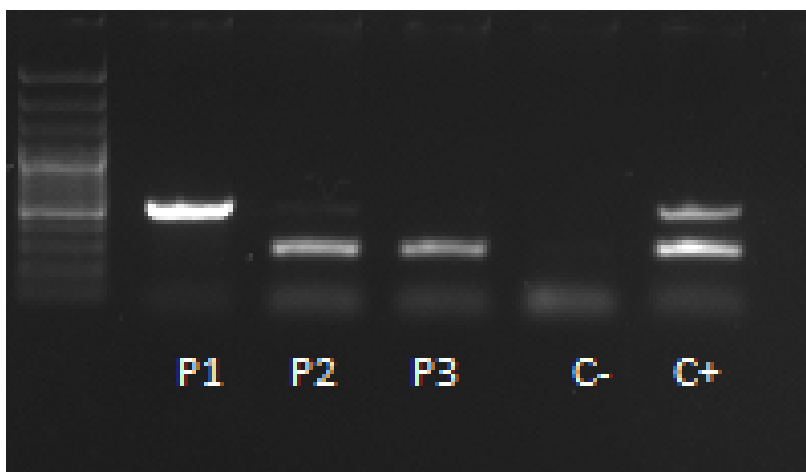


Figura 6.2. Electroforeză în gel de agaroză 1,5% a ampliconilor *nuc* (279 pb) și *mecA* (532 pb.)

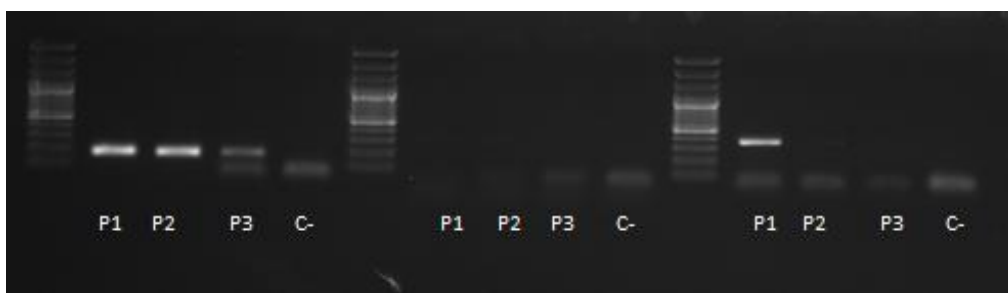


Figura 6.3. Electroforeza în gel de agaroză 1,5% a ampliconilor *blaZ* (173 pb.), *ermA* și *ermC* (190, respectiv 299 pb.) și *tetM* și *tetK* (158, respectiv 360 pb.)

La nivel molecular, s-a testat prezența la tulpinile analizate a mai multor gene: *fnbA*, *fnbB* și *fib* ce codifică pentru proteinele care leagă fibronectina (FnBPA și FnBPB), gena *cna* care codifică pentru proteina de legare a colagenului, gena *ebpS* care codifică proteina de legare a elastinei, genele *clfA* și *clfB* care codifică pentru factorul *clumping* (coagulaza legată), proteină asociată peptidoglicanului, care leagă fibrinogenul precum și prezenta genei *bbp* codificatoare pentru proteina de legare a sialoproteinelor din oase.

De asemenea s-a determinat prezența unor gene care codifică pentru o serie de toxine: gena *luk-pv* (pentru leucocidina Panton-Valentine), gene ale locusului *hlg* (codificatoare pentru gamma hemolizina), gene *seA-E* pentru enterotoxinele stafilococice, gena *tst* pentru toxina sindromului de șoc toxic.

Rezultatele obținute prin PCR efectuate sunt prezentate în tabelul VI.2.

Tabelul VI.2. – Rezultate obținute prin PCR

		<i>bbp</i>	<i>epbS</i>	<i>fbnB</i>	<i>fib</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>
	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	X	-		X	X
	<i>S. aureus</i>	-	-	-		X	X
Nr.	tulpina	<i>fnbA</i>	<i>cna</i>	<i>Luk-PV</i>	<i>hlg</i>	<i>tst</i>	<i>seA-E</i>
1.	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
2.	<i>S. aureus</i>	X	-	-	X	-	-
3.	<i>S. aureus</i>	X	-	-	X	-	-

6.5. Discuții

Un studiu realizat de Romano et al. a subliniat importanța identificării bacteriene corecte și precoce, în raport cu potențialul economic negativ al administrării de tratamente empirice sau al tratării decimentărilor sau mobilizărilor implantelor ca fiind de cauză aseptică. Beneficiul economic al sonicării stă în faptul că este utilizat un singur aparat fără costuri suplimentare și fără necesitatea unor reactivi costisitori. S-a demonstrat că stabilirea unui diagnostic incorect utilizând această tehnică, produce o povară asupra sistemului de sănătate este de doar 2%, în comparație cu alte metode mult mai sofisticate, al căror eșec în a stabili diagnosticul corect poate să ridice costurile cu până la 20%. Identificarea precisă a agenților microbieni duce la scăderea timpului de spitalizare a unor pacienți, prin aplicarea tratamentului corect, precoce, ceea ce duce la facilitarea reintegrării sociale a acestora și diminuarea costurilor pentru sistemul de sănătate. (46-47)

Într-un studiu realizat de Achermann et al. s-a demonstrat capacitatea superioară a tehnicii PCR multiplex pentru detecția microorganismelor. Testele realizate prin această tehnică au avut capacitate de detecție de 78%, în comparație cu identificarea prin cultură bacteriană din lichidul extras prin sonicare, care a avut o rată de identificare a agentului microbial de 62%. (48-49) PCR multiplex a demonstrat utilitatea și în cazul pacienților care au primit antibioterapie înainte de prelevarea de probe biologice, în aceste cazuri, prin

PCR multiplex s-a reușit identificarea în proporție de 100%, în condițiile în care metoda standard a prezentat o capacitate de detecție de doar 42%. (50-53) Totuși, trebuie să avem în vedere și posibilitatea unor rezultate fals negative, chiar și în cazul utilizării unor tehnici foarte sensibile. (50,53-56)

6.6. Concluzii

Diagnosticul realizat prin combinarea metodelor de sonicare și de biologie moleculară reușește să ofere foarte multe informații despre bacteriile studiate.

Studiul realizat în cadrul pregătirii doctorale nu se poate compara, numeric, cu studiile mai sus menționate. Cu toate acestea, tehnicile discutate în prezentul capitol nu sunt utilizate de rutină în țara noastră și ca atare inițiativa de a le pune în practică ar putea avea folos pentru viitor (chiar dacă numărul testărilor este mic). Pe de altă parte, așa cum se remarcă din prezentarea de mai sus, chiar dacă au fost studiate doar produsele provenind de la 3 pacienți, numărul de teste efectuate este foarte mare și destul de complex. Datele obținute sunt încurajatoare și duc la propunerea de continuare a colaborării și studiului în acest domeniu.

7. Concluziile tezei de doctorat și contribuțiile proprii

13.1. Concluziile tezei

Scopul studiului doctoral a fost cercetarea aplicativă, multidisciplinară a patologiei infecțioase în sfera ortopedie și traumatologiei precum și evaluarea și optimizarea unor tehnici de diagnostic microbiologice prin microcalorimetrie.

Privind infecțiile în ortopedie, acestea reprezintă un subiect dificil, complex, de mare responsabilitate, cu influențe directe asupra pacientului, familiei, sistemului de sănătate, atât medical cât și socio-economic.

Evoluția și prognosticul sunt în strânsă dependență de punerea unui diagnostic clinic, imagistic, de laborator, microbiologic, precis, eficient, cât mai rapid, precum și de instituirea tratamentului antibiotic țintit, asupra microorganismului izolat și identificat. Apariția și extinderea fenomenului de rezistență și multi-rezistență la antibiotice și chimioterapice impune pe de o parte cunoștințe aprofundate, teoretice și practice din partea clinicianului, iar pe de altă parte îmbunătățirea metodelor de diagnostic microbiologic, inclusiv a celor de testare a susceptibilității la medicamentele antimicrobiene. În cazul pacienților investigați au fost întâlnite atât cazuri de infecții cu microorganisme rezistente sau multi-rezistente cât și cazuri cu evoluție nefastă, spre deces. În cazul apariției unei

infecții, spre exemplu după un implant, costurile personale (ale pacientului), familiale și cele care se răsfrâng asupra sistemului sanitar pot fi semnificative.

Pe parcursul perioadei în care s-a desfășurat studiul epidemiologic, s-au internat 133 de pacienți, de la care s-au izolat 139 de microorganisme. Motivele internării au reprezentat fracturi, artroplastii, artrită septică post infiltrație intra-articulară, artrită septică fără intervenție chirurgicală. Majoritatea internărilor ($n = 56$) au reprezentat infecții secundare unor fracturi, urmate de artroplastii ($n = 44$) și artrite septice fără intervenție chirurgicală ($n = 22$), respectiv post infiltrație intra-articulară ($n = 11$). Șase pacienți au prezentat și o altă infecție, concomitent.

Staphylococcus aureus a fost microorganismul cel mai frecvent întâlnit în infecțiile ortopedice, înregistrând inclusiv tulpini cu rezistență și multi-rezistență. Din cele 77 de tulpini de *S. aureus*, 24 au prezentat un fenotip de rezistență izolată la cefoxitin (profil numit, în literatură, MRSA „comunitar”, *community acquired MRSA*), în timp ce 19 tulpini au avut profil de multi-rezistență (dintre care 14 fiind rezistenți la antibiotice din mai mult de 3 clase antibiotice diferite), iar 34 de tulpini au fost multi-sensibile.

Pe perioada studiului s-au înregistrat 40 de infecții cu enterobacterii, dintre care 16 cu *Klebsiella pneumoniae*, 10 cu *Escherichia coli*, 6 cu *Proteus* spp., 6 cu *Serratia marcescens* și 2 cu *Enterobacter* spp. Dintre acestea, 16 au prezentat fenotip ESBL (cu rezistență inclusiv față de cefalosporine de generația a III-a), în timp ce 3 tulpini au prezentat și rezistență la ertapenem. Nici un izolat din cele testate nu a prezentat rezistență la alte carbapeneme.

Microcalorimetria, element central al studiului doctoral, se dovedește o metodă ce permite obținerea de rezultate mai rapid și cu o sensibilitate crescută, în comparație cu alte tehnici clasice sau moderne. Studiul doctoral a arătat că microcalorimetria poate fi utilizată atât în scop diagnostic cât și în scopul determinării susceptibilității microorganismelor la antibiotice și chimioterapice.

Experiența acumulată lucrând cu *Candida albicans* permite extinderea studiilor, în cadrul Laboratorului de Biocalorimetrie, și la alți fungi.

Un element de noutate, negăsit în literatura de specialitate românească și străină se referă la temperatura optimă de dezvoltare a *C. albicans*, considerată quasi-unanim 28°C. Studiul doctoral, utilizând microcalorimetria izotermă a demonstrat că la 26°C fluxul de căldură este semnificativ mai mic. Începând cu 30°C creșterile se uniformizează însă se poate observa că cele două variabile (durata și fluxul de căldură) cresc progresiv până la 37°C pentru ca apoi să scadă atunci când experimentul este realizat la 40°C.

Studierea interacțiunii bacteriofag-bacterie, element de noutate în literatura de specialitate românească, s-a dovedit promițătoare. Studiul doctoral a deschis acest drum și a pus bazele pe care se pot realiza optimizarea cuantificării prezenței și efectului bacteriofagilor precum și investigarea răspunsului la o combinație între bacteriofagi și alte substanțe cu activitate antibacteriană.

Studiul doctoral, pornind de la materiale ortopedice extrase, utilizând o combinație între sonicare și amplificarea genetică prin PCR multiplex, a dovedit viabilitatea acestor metode, rezultatele obținute fiind încurajatoare și în concordanță cu datele din literatura de specialitate.

Atât în privința elementelor clinice, epidemiologice cât și în privința elementelor de laborator, studiul doctoral a demonstrat necesitatea extinderii colaborărilor cu spitale sau secții de profil din București și din țară.

Colaborarea între medicii din diferite specialități, ortopedie și traumatologie, boli infecțioase, medicină de laborator, microbiologie medicală, epidemiologie, imagistică precum și cu personalul implicat în activități de cercetare este deosebit de importantă. Colaborarea poate permite validarea unor metode, îmbunătățirea sau inovarea altor metode și în final aplicarea practică în cadrul sistemului de sănătate a metodelor puse la punct, pentru binele pacienților și binele societății.

13. 2. Contribuții personale

Am realizat un studiu de amploare asupra unor aspecte epidemiologice ale infecțiilor din sfera ortopedică în unul dintre cele mai mari spitale din România.

În cadrul studiului doctoral s-au realizat unele experimente în premieră pentru Laboratorul de Biocalorimetrie din Institutul Național de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu” din București, înregistrându-se curbe de creștere pentru *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp., *Candida albicans* și *Enterococcus faecalis*.

O altă noutate a pregătirii și studiului doctoral a fost reprezentată de evaluarea microcalorimetrică a unor tulpini de *Staphylococcus aureus*, izolate în clinică, demonstrând reproductibilitatea creșterii microcalorimetrice și în context clinic. Aceasta reprezintă un pas semnificativ în trecerea de la cercetare fundamentală la aplicare practică a tehnicii.

O provocare semnificativă a fost încercarea de a continua tradiția școlii românești de microbiologie, având ca reprezentant de seamă pe Profesorul Mihai Ciucă, în studiul practic al interacțiunii bacteriofag-bacterie. Evaluarea microcalorimetrică a acestei interrelații a fost realizată pentru prima dată în România în cadrul studiului doctoral.

Pentru o mai bună caracterizare a tulpinilor izolate și evaluării rolului pe care microcalorimetria îl poate juca în diagnosticul microbiologic și abordul infecțiilor ortopedice, am utilizat o serie de analize complementare, care, deși nu sunt disponibile în toate centrele, și-au câștigat deja locul în practica clinică: MALDI-TOF, utilizarea sonicării cuplată cu PCR multiplex. Crearea unei baze de colaborare între clinica de ortopedie și traumatologie a SUUB și echipe de cercetare recunoscute, reprezintă un element important de cercetare aplicativă.

Publicarea ca și co-autor a unei lucrări într-o revistă cotate ISI Thomson (FI: 3,287) precum și în calitate de prim autor a unei lucrări în ISI Proceedings reprezintă o onoare, dar și imbold de a continua cercetările și activitatea publicistică. Lista completă a lucrărilor publicate și a lucrărilor comunicate este prezentată în debutul tezei de doctorat.

Având în vedere studiul doctoral, teza de doctorat, cele menționate mai sus, precum și activitatea de diseminare a rezultatelor, se poate considera că obiectivele de cercetare stabilite la începutul pregătirii au fost atinse.

Microcalorimetria izotermă reprezintă o metodă rapidă și puțin costisitoare pentru evaluarea, diagnosticul microbiologic și testarea susceptibilității la antibiotice a microorganismelor izolate de la pacienți cu infecții ortopedice. Dezavantajul tehnico-economic este reprezentat de investiția inițială în sistemul microcalorimetric care rămâne și astăzi semnificativă.

Cercetările pot fi continuate prin optimizarea cuantificării prezenței și efectului bacteriofagilor asupra tulpinilor de *Salmonella*, cât și extinderea studiilor asupra altor microorganisme frecvent implicate în infecții ortopedice. Altă direcție de cercetare este studiul microcalorimetric în timp real a interacțiunii dintre bacteriofagi și alte substanțe cu activitate antibacteriană. Chiar dacă rezultatele obținute par atât interesante practic cât și deosebite de datele din literatura internațională (o altă temperatură optimă de dezvoltare a *C. albicans*), studiile trebuie continuate și validate prin cercetarea altor tulpini din genul *Candida* și alte genuri fungice.

Prima etapă a studiului doctoral este prezentată în secțiunea 1 prin colectarea și analiza de date privind toți pacienții internați și tratați pe secția de ortopedie și traumatologie a SUUB pentru infecții apărute în sfera musculo-scheletală. Datele colectate au fost în concordanță cu cele publicate în literatura de specialitate. Patologiile asociate cel mai frecvent întâlnite în rândul pacienților care au suferit o infecție sunt în primul rând la nivelul sistemului cardiac, urmate de obezitate, tabagism și alcoolism cronic, dar și cele care apar prin neglijență terapeutică (decompensarea diabetului zaharat sau a sindromului

varicos gambier). Majoritatea pacienților care au fost internați pe secția ATI au prezentat infecții cu germeni multi-rezistenți.

Informațiile au fost interpretate statistic și au fost prezentate în primul capitol coroborat cu date din literatură.

Următoarea etapă a studiului a fost realizarea de experimente microcalorimetrice utilizând tulpini standardizate (ATCC), prezentate în cadrul subcapitolului 2.3. Această etapă a fost necesară pentru acumularea de informații despre morfologia creșterii microcalorimetrice. Reproductibilitatea metodei impune aplicarea riguroasă a unui protocol de lucru, detaliat în cadrul secțiunii 2.2.1.

Utilizând protocolul standard am realizat studii de creștere microcalorimetrică asupra unei tulpini fungice (*C. albicans*), modificând corespunzător protocolului standard, detaliat în secțiunea 3.2.2. Realizarea acestor experimente în condiții diferite de temperatură și de volum a demonstrat că amprenta termică este un concept valabil și în cazul fungilor.

Luând în considerare apariția numeroaselor tipuri de bacterii multi-rezistente am realizat experimente de interacțiune bacterie-bacteriofag, deoarece utilizarea bacteriofagilor pentru tratamentul infecțiilor bacteriene este un concept viabil. În cadrul secțiunii 4 a lucrării sunt detaliate etapele parcurse. Pentru a observa interacțiunea dintre cele două am realizat experimente cu volume de bacteriofag din ce în ce mai mari în raport cu volumul introdus de bacterie obținând rezultate promițătoare.

După ce am realizat numeroase experimente utilizând microorganisme liofilizate în diferite condiții experimentale și am reușit elaborarea unui protocol de lucru viabil cu rezultate reproductibile, am început etapa principală a lucrării de doctorat, detaliată în secțiunea 5. Utilizând microcalorimetrul am investigat din punct de vedere termic tulpini bacteriene izolate din procese septice localizate la nivelul sistemului musculo-scheletal. Rezultatele au fost promițătoare, majoritatea curbelor descrise fiind reproductibile și superpozabile cu cele realizate utilizând tulpinile ATCC. Așa cum am observat în secțiunea dedicată studiului epidemiologic, majoritatea tulpinilor au fost de *S. aureus* însă am efectuat experimente și cu alte tipuri de microorganisme.

Ultima etapă a studiului prezentată în cadrul secțiunii 6, combină metoda sonicării implantelor de uz ortopedic infectate cu tehnici de biologie moleculară pentru caracterizarea extinsă a agenților patogeni. Acest protocol de lucru a fost aplicat pe 3 implante extrase în cadrul secției de ortopedie a SUUB și în tandem cu studiul microcalorimetric, rezultatele regăsindu-se în cadrul secțiunii 5.

Bibliografie (selectivă)

1. Katz NP, Paillard FC, Ekman E. Determining the clinical importance of treatment benefits for interventions for painful orthopedic conditions. *J Orthop Surg Res.* 2015;10:24
2. Varnum C, Pedersen AB, Rolfson O, et al. Impact of hip arthroplasty registers on orthopaedic practice and perspectives for the future. *EFORT Open Rev.* 2019;4(6):368-376
3. DiSilvestro KJ, Santoro AJ, Tjoumakaris FP, et al. When can I drive after orthopaedic surgery? A systematic review. *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474(12):2557-2570
4. Jiang B, Liang S, Peng ZR, et al. Transport and public health in China: the road to a healthy future. *Lancet.* 2017;390(10104):1781-1791
5. Pascal-Moussellard H, Hirsch C, Bonaccorsi R. Osteosynthesis in sacral fracture and lumbosacral dislocation. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016;102(1 Suppl):S45-57
6. DeKeyser GJ, Kellam PJ, Haller JM. Locked Plating and Advanced Augmentation Techniques in Osteoporotic Fractures. *Orthop Clin North Am.* 2019;50(2):159-169
7. Hexter AT, Hislop SM, Blunn GW, Liddle AD. The effect of bearing surface on risk of periprosthetic joint infection in total hip arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J.* 2018;100-B(2):134-142
8. Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res.* 2019;37(5):997-1006
9. **Popa Mihnea GI**, Panti Z, Ene R, et al. Infecție în sfera ortopedică diseminată hematogen la 2 ani după operație. *Infectio.ro.* 2016;46(2):40-43
10. Bori G, McNally MA, Athanasou N. Histopathology in Periprosthetic Joint Infection: When Will the Morphomolecular Diagnosis Be a Reality? *Biomed Res Int.* 2018;2018:1412701
11. Antonescu D. Ortopedie-Traumatologie. Vol X. IN *Tratat de chirurgie – sub red. Popescu I. Ed. Academiei Române.* 2018.
12. Azar FM, Canale ST, Beaty JH. Ed. *Campbell's Operative Orthopedics*, 4-volume Set. 13th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. 2017.

13. Rowan FE, Donaldson MJ, Pietrzak JR, Haddad FS. The Role of One-Stage Exchange for Prosthetic Joint Infection. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018;11(3):370-379
14. Mattiassich G, Ortmaier R, Rittenschober F, Hochreiter J. Diagnostic parameters in periprosthetic infections: the current state of the literature. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2018;28(8):1573-1580
15. Shao J, Zhang H, Yin B, et al. Risk factors for surgical site infection following operative treatment of ankle fractures: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg.* 2018;56:124-132
16. Mihai MM, Holban AM, Giurcaneanu C, et al. Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(16):1552-76
17. Shao J, Chang H, Zhu Y, et al. Incidence and risk factors for surgical site infection after open reduction and internal fixation of tibial plateau fracture: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg.* 2017;41:176-182
18. Gheorghe A, Moran G, Duffy H, et al. Health Utility Values Associated with Surgical Site Infection: A Systematic Review. *Value Health.* 2015;18(8):1126-37
19. Triantafyllopoulos G, Stundner O, Memtsoudis S, Poultides LA. Patient, Surgery, and Hospital Related Risk Factors for Surgical Site Infections following Total Hip Arthroplasty. *Sci World J.* 2015;2015:979560
20. De Vries FE, Wallert ED, Solomkin JS, et al. A systematic review and meta-analysis including GRADE qualification of the risk of surgical site infections after prophylactic negative pressure wound therapy compared with conventional dressings in clean and contaminated surgery. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(36):e4673
21. Wadsö I. Isothermal microcalorimetry in applied biology. *Thermochimica Acta.* 2002;394:305-311
22. Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniels AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion.* 2007;47(9):1643-1650
23. Braissant O, Wirz D, Göpfert B, et al. Biomedical Use of Isothermal Microcalorimeters. *Sensors (Basel).* 2010;10(10):9369-9383

24. Braissant O, Keiser J, Meister I, et al. Isothermal microcalorimetry accurately detects bacteria, tumorous microtissues, and parasitic worms in a label-free well-plate assay. *Biotechnol J*. 2015;10(3):460-468
25. Alklint C, Wadsö L, Sjöholm I. Accelerated storage and isothermal microcalorimetry as methods of predicting carrot juice shelf-life. *J Sci Food Agriculture*. 2005;85(2):281-285
26. Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. *Ann Rev Microbiol*. 1949;3(1):371-394
27. Maskow T, Wolf K, Kunze W, et al. Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry. *Thermochimica Acta*. 2012;543(0):273-280
28. Beezer AE, Bettelheim K, Newell RD, Stevens J. Diagnosis of bacteriuria by flow microcalorimetry: preliminary report. *Sci Tools*. 1974;21:13-16
29. **Popa Mihnea**, Popa V, Muntean AA, et al. Using microcalorimetric thermograms to describe the growth patterns of *Candida albicans*. Carol Davila University of Medicine Congress, 5th edition, Bucharest, May 2017, abstract published in the supliment of *Mædica J Clin Med*, 2017;12(15):31
30. Borriello SP, Murray PR, Funke G. ed 10. Hodder Arnold; London. 2005. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.
31. de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10:428-35
32. Livermore DM. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(Suppl 4):1-9
33. Zaharia DC, **Popa Mihnea G**, Steriade AT, et al. Microcalorimetry - a new method for bacterial characterisation. *Pneumologia*. 2013;62(4):232-5
34. Poenaru A, Neagu A, **Popa Mihnea G**, Ghita I. Determinarea rapidă a susceptibilității la gentamicină a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 prin microcalorimetrie. Lucrare prezentată oral la CNSTM, București, decembrie 2016
35. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008;9:261-6
36. Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(4):67
37. Tkhilaishvili T, Di Luca M, Abbandonato G, et al. Real-time assessment of bacteriophage T3-derived antimicrobial activity against planktonic and biofilm-

embedded *Escherichia coli* by isothermal microcalorimetry. Res Microbiol. 2018;169(9):515-521

38. Tkhilaishvili T, Lombardi L, Klatt AB, et al. Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus*. [Int J Antimicrob Agents](#). 2018;52(6):842-853

39. Zaharia DC, Muntean A, **Popa Mihnea G**, et al. Comparative analysis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* microcalorimetric growth. BMC Microbiol. 2013;13:171 (**Factor de impact: 3,287**)

40. **Popa Mihnea**, Ene R, Streinu-Cercel A, et al. Algic Syndrome in Osteoarticular Infectious Pathology; Detection and Rapid Treatment of the Causative Agent Using Microcalorimetry. Proceedings of The 14th National Congress of Urogynecology (7-9 September 2017) and of The National Conference of The Romanian Association for the study of pain (26-27 October 2017), Bucharest. Filodiritto Publisher. 2017:589-594 (**Indexat ISI Thomson**)

41. **Popa Mihnea G**, Ene R, Popa V, et al. Posibilitatea diagnosticului infecțiilor ortopedice folosind microcalorimetria. Infectio.ro. 2018;54(2):32-35

42. **Popa Mihnea G**, Panti Z, Nica M, et al. Asocierea morbidă dintre tratamentul anticoagulant pe termen lung și o infecție de proteză ortopedică. Infectio.ro. 2016;47(3):38-42

43. **Popa Mihnea G**, Ene R, Popa V, et al. Microcalorimetria, utilitate și reproductivitate în diagnosticul infecțiilor ortopedice cu *Staphylococcus aureus*. Infectio.ro. 2018;53(1):22-25

44. **Popa Mihnea G**, Panti Z, Nica M, et al. Microcalorimetria – o metodă cu potențial în diagnosticul infecțiilor ortopedice. Infectio.ro. 2017;49(1):42-45

45. **Popa Mihnea**, Pleniceanu M, Nica M, et al. Using microcalorimetric thermograms to identify pathogen agents in the orthopedics field. Carol Davila University of Medicine Congress, 5th edition, Bucharest, May 2017, abstract published in the supliment of Mædica J Clin Med, 2017;12(15):31

46. Song Z, Borgwardt L, Hoiby N, et al. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. Orthop Rev (Pavia). 2013;5(2):65-71

47. Romano CL, Trentinaglia MT, De Vecchi E, et al. Cost-benefit analysis of antibiofilm microbiological techniques for peri-prosthetic joint infection diagnosis. BMC Infect Dis. 2018;18(1):154

48. Markoulatos P, Siafkas N, Moncany M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: a practical approach. *J Clinical Lab Analysis*. 2002;16:47-51
49. Piper K, Jacobson M, Cofield R, et al. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection using implant sonication. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1878-1884
50. Girasole M, Dinarelli S, Boumis G. Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale. *Micron (Oxford, England 1993)*. 2012;43(12):1273-1286
51. Markoulatos P, Samara V, Siafakas N, et al. Development of a quadriplex polymerase chain reaction for human cytomegalovirus. *J Clin Lab Anal*. 1999;13:99-105
52. Cuzin M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol*. 2001;8:291-296 Cuzin M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol*. 2001;8:291-296
53. De Man, P. Graber, M. Luem, et al. Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection. *Infection*. 2009;37:292-294
54. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, et al. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1208-14
55. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*. 1997;23(3):504-11
56. Morgenstern C, Cabric S, Perka C, et al. Synovial fluid multiplex PCR is superior to culture for detection of low-virulent pathogens causing periprosthetic joint infections. *Diagnostic Microbiol Inf Dis*. 2018;90(2):115-119