
ROMANIAN ARCHIVES
OF
MICROBIOLOGY
AND
IMMUNOLOGY

Founded by
PROFESSOR ION CANTACUZINO

VOLUME 71 - Issue 3
July - September 2012

Published quarterly
by
CANTACUZINO INSTITUTE BUCHAREST

TOTAL PUBLISHING HOUSE

ROMANIAN ARCHIVES
OF
MICROBIOLOGY
AND
IMMUNOLOGY

ISSN 1222-3891

INDEXED IN MEDLINE
CNCIS Category B+

Editor-in-Chief: Radu IORDĂCHEL

Deputy Editor: Aurora SĂLĂGEANU

Editorial Board: Viorel ALEXANDRESCU, Antonis ANTONIADIS, Jean-Marc CAVAILLON, Ana CĂLUGĂRU, Cornelia CEIANU, Carmen CHIFIRIUC, Irina CODIȚĂ, Lidia CREMER, Maria DAMIAN, Angel GALABOV, Luminița Smaranda IANCU, Gabriel IONESCU, Anca ISRAIL, Emilia LUPULESCU, Adrian ONU, Roxana MOLDOVAN, Geza MOLNAR, Marian NEGUȚ, Hervé PELLOUX, Alexandru RAFILA, Dorel Lucian RADU, Constantin SPĂNU, Demetrios SPANDIDOS, Dan STERIU, Galina TSENEVA, Codruța Romanița USEIN, Hans WOLF

Editorial Staff: Felicia RAPILAT, Monica TRĂISTARU

TOTAL PUBLISHING HOUSE

Subscription orders:

Orders can be placed directly with the publisher:

„Cantacuzino“ National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology

C.P. 1-525, Splaiul Independentei 103, 050096, București, România

Fax: (40.21)306.93.07

E-mail: archives@cantacuzino.ro

www.roami.ro

Întreaga responsabilitate privind conținutul și forma rezumatelor aparține autorilor.
The whole responsibility concerning abstract content and presentation belongs to the authors.

Copyright © 2012 CANTACUZINO INSTITUTE Bucharest



Consiliului Național al Cercetării Științifice



Unitatea Executivă pentru
Finanțarea Învățământului Superior,
a Cercetării, Dezvoltării și Inovării

Conference
**“Diaspora in Romanian Scientific
Research and Education”**

Bucharest, September 25-28, 2012

Conferința
**„Diaspora în Cercetarea Științifică
și Învățământul Superior din România”**

București, 25-28 septembrie 2012



EXPLORATORY WORKSHOP (WE20)

Microorganism-Host Interaction in Infectious Diseases Pathogenesis

**Cantacuzino National Institute of Research-Development
for Microbiology and Immunology, Bucharest**

September, 26-27, 2012

WORKSHOP EXPLORATORIU (WE20)

Interrelația microorganism-gazdă în patogeneza bolilor infecțioase

**Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru
Microbiologie și Imunologie Cantacuzino, București**

26-27 septembrie 2012

Coordinators / Coordonatori:
Dr. MARIA DAMIAN, CS I
Dr. NICOLAE CORCIONIVOSCHI, CS I

Organizing Committee / Comitetul de organizare:
Dr. RADU IORDĂCHEL, CS I
Prof. Dr. MARIAN NEGUȚ, CS I
Prof. Dr. LUMINIȚA SMARANDA IANCU
Conf. Dr. IRINA CODIȚĂ
Conf. Dr. MARIANA CARMEN CHIFIRIUC
As. Univ. ALEXANDRA-MARIA NĂȘCUȚIU, CS III
Șef lucrări Dr. GABRIEL IONESCU
Bioch. Drd. SORIN DINU, CS

CONTENTS

ABSTRACTS WE20 / REZUMATE WE20

SESSION 1 – PATHOGEN-HOST INTERACTION

- 113 **1. Host-Microorganism Interactions: from Symbiosis to Disease**
Maria Damian
- 115 **2. The Human Host and Hepatitis C Virus: a Tolerance and Aggression Affair**
Gabriela Oprișan, Sorin Dinu, Monica Străuț
- 117 **3. *Drosophila melanogaster* – an Eukaryotic Model for the Study of Host-Parasite Relationship, Consecutive to Experimental Infections with *Pseudomonas aeruginosa***
Alexandru Al. Ecovoiu, Attila Cristian Rațiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc

SESSION 2 – MICROBIAL VIRULENCE AND MECHANISMS OF PATHOGENICITY (1)

- 118 **4. Correlation Between HBV Genotype and Precore/Core Mutation**
Luminița Smaranda Iancu
- 120 **5. Virulence Factors of Periodontal Pathogens**
Cătălina Suzana Stîngu
- 121 **6. Virulent Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Influenza Virus – the Killing Couple**
Irina Codiță
- 123 **7. Virulence Factors of Community and Hospital Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains**
Székely Edit, Molnár Szabolcs, Vas Krisztina Eszter, Szócs-Gazdi Uzonka, Doina Bilca, Lőrinczi Lilla

SESSION 3 – MICROBIAL VIRULENCE AND MECHANISMS OF PATHOGENICITY (2)

- 124 **8. From a Virulence Factor to a Rapid Elucidation of a Multinational Food-borne Outbreak with *Listeria monocytogenes***
Steliana Huhulescu, Ulrich Sagel, Werner Ruppitsch, Anna Stöger, Franz Allerberger, Ariane Pietzka
- 126 **9. Emergent Human Listeriosis in Romania**
Dana-Magdalena Caplan, Alina-Maria Holban, Marius-Eduard Caplan, Alina-Maria Borcan
- 127 **10. *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia: Virulence Soluble Factors and Antibioresistance Hallmarks**
Elvira Borcan, Camelia Mihaela Ghiță, Veronica Lazăr
- 129 **11. Phenotypic and Genotypic Study of Virulence and Resistance Features in Food Borne Bacteria**
Andreea Lorena Mateescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Mihaela Magdalena Mitache, Luminița Măruțescu, Tatiana Vassu Dimov

SESSION 4 – ANTIBIOTIC SENSITIVITY / RESISTANCE

- 131 **12. Phenotypic and Genetic Screening of Beta-Lactamases Mediated Resistance Amongst Clinical Isolates of Gram Negative Bacilli from Romanian Hospitals**
Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc, Luminița Gabriela Măruțescu, Ani Cotar, Otilia Banu, Elvira Borcan, Veronica Lazăr, Grigore Mihăescu
- 133 **13. Phenotypic and Molecular Analysis of Beta-Lactam Susceptibility Profiles and Resistance Mechanisms in Opportunistic, Non-Fermenting Gram Negative Rods**
Irina Gheorghe, Mariana Carmen Chifiriuc, Luminița Gabriela Măruțescu, Otilia Banu, Veronica Lazăr
- 135 **14. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Biopsies**
Luminita Gabriela Măruțescu, Marcela Popa, Mădălina Ilie, Alina Baltac, Daria Bălăceanu, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr

SESSION 5 – ANTI-INFECTIOUS DEFENSE

- 137 **15. Interaction of α -Synuclein with Cellular Membranes**
Imola Gabriela Zigoneanu
- 138 **16. Generation of EBV-specific CTLs for Adoptive Immunotherapy for Refractory PTLD Encountered in Pediatric SOTx Patients**
Iulia Popescu
- 140 **17. The Role of Catecholamine Stress Hormones in *Pseudomonas aeruginosa* - Host Communication**
Alina Maria Holban, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr
- 142 **18. Soluble Molecules Secreted by Bacterial Cells Could Modulate HeLa Cells Functions to Prevent the Development of Viral Infection**
Coralia Bleotu, Mariana Carmen Chifiriuc, Grațiela Pîrcălăbioru, Roxana Drăgușel, Ioana Mădălina Aldea, Carmen Cristina Diaconu, Veronica Lazăr, Costin Eugen Cernescu
- 143 **19. Application of Reverse Vaccinology in Designing a Vaccine for *Staphylococcus aureus* Infectious Endocarditis**
Mihaela Oprea

SESSION 6 - NEW PRODUCTS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

- 145 **20. Nanotechnology Applications in Essential Oils Pharmaceutical Formulations for the Management of Biofilms Related Infections**
Crina-Maria Kamerzan (Saviuc), Alexandru Mihai Grumezescu, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr
- 147 **21. Vegetal Extracts with Antiinflammatory Activity on Bacterial LPS Stimulated Endothelial Cells**
Brîndușa Dumitriu, Laura Olariu, Crina Saviuc, Mariana Constantinovici
- 149 **22. The Interaction of Gentamicin Encapsulated Polysaccharides with Selected Invasive Bacteria**
Cristina Croitoru, Alexandru Mihai Grumezescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr
- 151 **23. Challenges for the Development of New Antimicrobial Strategies**
Mariana Carmen Chifiriuc, Alexandru Mihai Grumezescu, Veronica Lazăr
- 153 AUTHOR INDEX

Abstracts WE20 / Rezumate WE20

Session 1 – Pathogen-Host Interaction *Sesiunea 1 – Interacțiunea patogen-gazdă*

1. HOST-MICROORGANISM INTERACTIONS: FROM SYMBIOSIS TO DISEASE / INTERRELAȚIA MICROORGANISM-ORGANISM GAZDĂ: DE LA SIMBIOZĂ LA STAREA DE BOALĂ

Maria Damian

*Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology, Bucharest /
Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie Cantacuzino, București*

Microorganisms, especially bacteria, able to colonise every ecological niche, are the most predominant living organisms on the planet, partly due to their high level adaptability and great evolutionary potential. The human body seems to be the preferred host. For a long time the microorganisms were considered aggressive for the host organisms and as a result the host developed a defence mechanism finalised by either microorganism elimination or disease. Later on, due to the improvement of the knowledge regarding the role of each of the parts involved in the host-microorganism relation, it was found that the relation is not always ended by disease, and the healthy human body is harbouring much more bacterial cells than self cells, in most of cases with beneficial effect for humans. Complex symbiotic host-microorganism interactions are essential for host life, every imbalance leading to a great variety of diseases.

Many studies on bacterial virulence and their pathogenicity were performed, based on the observations that some microorganisms recognized as pathogenic do not determine disease in every host, that microorganisms defined as non-pathogenic can produce disease in some hosts,

Microorganismele, în special bacteriile, reprezintă forma de viață dominantă pe planetă ca urmare a nivelului înalt de adaptabilitate și a imensului lor potențial evolutiv. Pot coloniza orice nișă ecologică, cu predilecție organismul uman. Multă vreme, microorganismele au fost considerate agresori ai organismelor superioare, reacția organismului gazdă fiind cea de apărare antiinfecțioasă, rezultatul concretizându-se fie prin eliminarea microorganismului, fie prin declanșarea stării de boală. Mai târziu, odată cu acumularea cunoștințelor privind rolul fiecăreia dintre părți în relația microorganism-organism gazdă, s-a ajuns la concluzia că nu totdeauna această interrelație conduce la boală, organismul uman sănătos găzduind mai multe celule bacteriene decât propriile celule, de cele mai multe ori cu efect benefic. Interrelațiile complexe gazdă-microorganism de tip mutual sunt esențiale pentru viață, dereglarea echilibrului acestora putând conduce la o mare varietate de boli.

Pornind de la observațiile că unele microorganismele, deși definite ca patogene, nu determină boală la orice gazdă, altele definite ca nepatogene produc îmbolnăviri la anumite gazde, iar anumite situsuri ale organismului uman (gură,

and that some human sites (mouth, gut, skin) are harbouring an impressive number of microorganisms without developing disease. A theory that the microbial pathogenesis is not only an effect of virulence expression but rather a result of the interaction host-pathogen was developed.

Moreover, by laboratory experiments, it was found that the virulence of microorganisms can be modified by animal and/or cellular lines passage and attenuated as well as high virulent microorganisms can be obtained by genetic transfer. Also, the observation that in an epidemic due to a high pathogenic microorganism not all the contact people become sick enhanced the theory of the role of each part in the infectious processes.

As a consequence, a revision of pathogen, pathogenicity, virulence or virulence determinants definition as well as of the terms used to express the microorganism-host interaction was proposed. Adaptation, asymptomatic, transient or persistent carriage, transmission or relapse, colonization, infection, infectious disease, infestation, elimination, mutualism/ symbiosis, opportunism, commensalism, persistence, chronicity or latency are relations developed between host and microorganism as a consequence of their coevolution and of a cross-talk effect.

Keywords: host-microorganism interactions, pathogenicity, virulence, mutualism, commensalism, infection, germ carrier.

intestin, piele) găzduiesc un număr impresionant de microorganisme, fără ca acestea să determine îmbolnăviri, s-au făcut numeroase studii privind virulența și patogenitatea microbiană și s-a ajuns la concluzia că patogeneza microbiană nu este numai un efect al exprimării factorilor de virulență, ci mai ales rezultatul interrelației între patogen și gazdă. Mai mult, prin experimente de laborator, s-a constatat că virulența microorganismelor poate fi crescută sau diminuată prin pasaj pe animal, pe linii celulare sau prin transfer genetic. Un alt fapt de observație este acela că în epidemii determinate de microorganisme înalt patogene, nu toată populația care vine în contact cu microorganismul dezvoltă boala. Prin urmare, s-a propus revizuirea termenilor de patogen, patogenitate, virulență sau determinant de virulență, dar și o reexaminare a termenilor utilizați pentru a exprima interrelația microorganism-gazdă.

Adaptare, portaj asimptomatic, tranzitoriu sau persistent cu recădere sau transmitere, colonizare, infecție, boală infecțioasă, infestare, eliminare, mutualism, simbioză, oportunism, comensalism, persistență, cronicizare sau latență sunt relații stabilite între organism gazdă și microorganisme ca urmare a coevoluției acestora și a efectului de „cross-talk”.

Cuvinte cheie: interrelații microorganism-gazdă, patogenitate, virulență, mutualism, comensalism, infecție, purtător.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Casadevall A, Pirofski L-A. (1999) Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect Immun*, 67, 8:3703-3713.
- Casadevall A, Pirofski L-A. (2000) Host-Pathogen Interactions: Basic Concept of Microbial Commensalism, Colonization, Infection and Disease. *Infect Immun*, 68, 12:6511-6518.
- Everett ML, Palestrant D, Miller SE, Bollinger RR, Parker W. (2004) Immune exclusion and immune inclusion: A new model of host-bacterial interactions in the gut. *Clin Applied Immunol Rev* 4:321-332.
- Freitas M, Tavan E, Cayuela C, Diop L, Sapin C, Trugnan G. (2003) Host-pathogen cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell*, 95:503-506.
- Rouabhia M. (2002) Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status. *Can J Infect Dis*, 13, 1:47-51

2. THE HUMAN HOST AND HEPATITIS C VIRUS: A TOLERANCE AND AGGRESSION AFFAIR / GAZDA UMANĂ ȘI VIRUSUL HEPATITEI C: O RELAȚIE BAZATĂ PE TOLERANȚĂ ȘI AGRESIVITATE

Gabriela Oprișan, Sorin Dinu, Monica Străuț

*Molecular Epidemiology Laboratory, Cantacuzino National Institute of Research - Development
in Microbiology and Immunology / Laboratorul de Epidemiologie Moleculară, INCDMI Cantacuzino*

HCV causes chronic infection in the majority of cases by mechanisms that may operate predominantly in the liver where the unique hepatic environment favors tolerance rather than immunity to foreign antigens.

The hepatitis C virus (HCV) genotype 1b is associated with higher rates of liver cirrhosis and poorer response to antiviral therapy. Sustained virological response to pegylated interferon/ribavirin is achieved in only half of genotype 1-infected patients (prevalent in Romania). Starting 2011, new treatments have been available including specific protease inhibitors in addition to PEG-Interferon (IFN) and ribavirin. Failure of IFN-based treatments to eradicate HCV infection has been shown to be related to virological (HCV genotype, variability, viral load, on-treatment viral kinetics), host genetic determinants (genetic variation near the IL28B gene) and non-genetic factors (age, sex, fibrosis, etc.). The variability of HCV genomes appears to play a major role in viral persistence, cell tropism of viral variants, pathogenicity and resistance to antiviral therapy.

HCV Genotype is a major predictor of treatment response. HCV variants can be classified into six genotypes, each with different subtypes. HCV genotypes 1 and 4 are intrinsically more resistant to the antiviral action of IFN alpha than genotypes 2 and 3. Mutations in several subgenomic regions of HCV have been related to sensitivity to IFN treatment. Amino acid substitutions at positions 70 and 91 of the HCV core region have been reported to be associated with response to Pegylated interferon / Ribavirin therapy.

Among the host markers, the IL28B gene region (that encodes IFN-lambda 3 - type III IFN) has been reported by several genome-wide as-

Virusul hepatitei C (HCV) este responsabil pentru majoritatea cazurilor de hepatită cronică a cărei evoluție este favorizată de mecanisme particulare de la nivel hepatic ce promovează mai degrabă toleranța imunitară în defavoarea răspunsului față de antigenele virale.

Infecțiile cu tulpini virale HCV aparținând subtipului 1b sunt asociate cu un risc mai crescut de apariție a cirozei hepatice și cu răspunsul scăzut la terapia antivirală. Răspunsul viral susținut la terapia cu interferon pegylat este obținut doar la jumătate din pacienții infectați cu tulpini virale aparținând genotipului 1 (prevalent în România). Din 2011, pe lângă terapia cu PEG-Interferon (IFN) și ribavirină, sunt disponibile noi antivirale ce funcționează ca inhibitori ai unei proteaze virale. Insuccesul eradicării infecției cu HCV în urma tratamentului cu interferon a fost asociat cu factorii virali (genotip, variabilitate genetică, încărcătură virală, dinamica încărcăturii virale în timpul tratamentului), cu determinanții genetici ai gazdei (variații genetice în proximitatea genei ce codifică IL28B), dar și cu factori non-genetici (vârstă, sex, fibroză hepatică etc.). Se pare că variabilitatea genomului HCV joacă un rol central în persistența virală, tropismul celular al variantelor virale, patogenitate și rezistență la terapia cu antivirale. Genotipul HCV este un predictor important al răspunsului la tratamentul cu antivirale. Variantele virale sunt clasificate în șase genotipuri, fiecare fiind divizat în mai multe subtipuri. Genotipurile 1 și 4 prezintă o rezistență intrinsecă mai mare la tratamentul cu IFN alfa față de genotipurile 2 și 3. Mutațiile localizate în diferite regiuni subgenomice ale HCV au fost asociate cu sensibilitatea la tratamentul cu IFN. Substituțiile aminoacizilor din pozițiile 70 și 91 ale proteinei virale core au fost asociate cu răs-

sociation studies as a major predictor of HCV treatment response and of viral kinetics during HCV therapy. The presence of the CC inherited polymorphism in the IL28B gene has been associated with higher rates of therapeutic success, especially for genotypes 1 and 4, compared with the presence of CT or TT polymorphisms.

A decision model including host and viral factors implicated in resistance to current and the new therapies has the potential to support selection of the optimum treatment in the context of personalized medicine.

Keywords: Hepatitis C virus; therapy resistance; HCV genotype; virus mutations in the core region; genetic polymorphism near the IL28B gene.

punsul la terapia cu PEG-Interferon și ribavirină. Regiunea din proximitatea genei IL28B (care codifică IFN-lambda 3) a fost descrisă în unele studii genomice ca predictor major al răspunsului la tratamentul antiviral și al evoluției încărcăturii virale în timpul acestuia. Prezența polimorfismului CC în apropierea genei IL28B a fost asociat cu rate mai mari ale succesului terapeutic, în special în cazul infecțiilor cu genotipurile 1 și 4, comparativ cu prezența polimorfismelor CT și TT.

Un model decizional bazat pe factori virali și ai gazdei, implicați în rezistența la tratamentele antivirale curente, cât și față de cele noi, poate asigura succesul tratamentului hepatitei virale cu virus C, în contextul medicinei personalizate.

Cuvinte cheie: Virusul Hepatitei C (HCV); rezistența la tratament; genotip HCV; mutații în regiunea capsidei virale (core); polimorfism genetic în proximitatea genei IL28B.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y *et al.* (2007) Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology*, 50(5): 361-8.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ *et al.* (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262): 399-401.
- Rauch A, Rohrbach J, Bochud PY. (2010) The recent breakthroughs in the understanding of host genomics in hepatitis C., 40(10): 950-9.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G *et al.* (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41(10): 1100-4.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M *et al.* (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41(10): 1105-9.

3. DROSOPHILA MELANOGASTER – AN EUKARYOTIC MODEL FOR THE STUDY OF HOST-PARASITE RELATIONSHIP, CONSECUTIVE TO EXPERIMENTAL INFECTIONS WITH PSEUDOMONAS AERUGINOSA / DROSOPHILA MELANOGASTER, MODEL EUCARIOT PENTRU STUDIUL INTERACȚIUNILOR GAZDĂ-PARAZIT ÎN INFECȚII EXPERIMENTALE CU PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Alexandru Al. Ecovoiu, Attila Cristian Rațiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc

University of Bucharest, Faculty of Biology, Department of Genetics/Microbiology /
Universitatea din București, Facultatea de Biologie, Departamentul de Genetică/Microbiologie

Drosophila melanogaster is a classical model organism widely employed in various fields of biology, as genetics, molecular biology, evolution and behavior, but also in researches concerning the understanding of the immune response and evolution of the immune system. We present herein the advantages of using this eukaryotic model for the study of host-parasite relationships consequent to experimental infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Extrapolation of data obtained with *D. melanogaster* model to the mammalian cells would allow a better understanding of complex interaction mechanisms between the host organism and pathogenic bacteria.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *Pseudomonas aeruginosa*, colonization, infection, immunity.

Drosophila melanogaster este un organism model utilizat pe scară largă în domeniile ale biologiei, precum genetica, biologia moleculară, evoluționismul și etologia, precum și în cercetări referitoare la înțelegerea mecanismelor răspunsului imun și a evoluției sistemului imunitar. În această prelegere vor fi prezentate avantajele utilizării acestui model eucariot în studiul relațiilor gazdă-parazit, consecutive infectării experimentale cu bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Extrapolarea la celula mamaliană a datelor obținute pe modelul *D. melanogaster* va permite o mai bună înțelegere a mecanismelor de interacțiune dintre organismul gazdă și bacteriile patogene.

Cuvinte cheie: *Drosophila melanogaster*, *Pseudomonas aeruginosa*, colonizare, infecție, imunitate.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Apidianakis Y, Rahme LG. (2009) *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Nat Protoc*, 4: 1285-1294.
- Apidianakis Y, Rahme LG. (2011) *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology, *Dis Model Mech*, 4: 21–30.
- Pandey UB, Nichols CD. (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery, *Pharmacol Rev*, 63: 411-436.

Session 2 – Microbial Virulence and Mechanisms of Pathogenicity (1) Sesiunea 2 - Virulența microbială și mecanisme de patogenitate (1)

4. CORRELATION BETWEEN HBV GENOTYPE AND PRECORE/CORE MUTATION CORELAȚII ÎNTRE GENOTIPUL VHB ȘI MUTAȚIILE DE LA NIVELUL REGIUNII PREC/C

Luminița Smaranda Iancu

*Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași; National Institute
of Public Health/Regional Center of Public Health, Iași /*

UMF “Grigore T. Popa”-Iași; Institutul Național de Sănătate Publică/Centrul Regional de Sănătate Publică, Iași

Despite general vaccination in countries with HBsAg prevalence more than 8%, HBV infection remains a real public health problem worldwide, 350 to 400 million infected people. In the last 30 years studies that reveal different mutations have been published, and Mediterranean strains were for the first time described in the early 1980'. Later, in 1989 scientists identified two types of HBV genome mutations, as pre-core and core promoter mutations that have as main result the lack of HBeAg in HBV/DNA positive patients with chronic liver diseases. Since then, authors from different countries have reported such strains. In a study from 1996, Iancu LS *et al.*, using HBV/DNA sequence analysis demonstrated that 2 from 4 tested strains were wild type and other two had different mutations; one, from HBeAg negative child with chronic active hepatitis (CAH), had a pre-core mutation with G to A substitution at nucleotide (nt) 1896, resulting in the TAG stop codon described in literature. In this study, when samples were tested in the Laboratory of Royal Free Hospital in London, the second strain from a six year old child with CAH and negative for HBeAg contained a point mutation at nt 1938 (codon GTG, valine to GAG, glutamic acid) among others (nt: 1961, 1966 and 1969); this new mutation seems to be similar with the mu-

Deși infecția determinată de virusul hepatitei B (VHB) dispune de vaccinarea obligatorie, în țările în care prevalența AgHBs în populația generală este peste 8%, există la nivel mondial, conform estimărilor OMS, aproximativ 350-400 milioane persoane sunt afectate încă de această infecție. În ultimii 30 de ani, numeroase studii au raportat existența tulpinilor mediteraneene, semnalate încă de la începutul anilor 80'. Mai târziu, în 1989, cercetătorii au identificat două tipuri de mutații la nivelul regiunii preC/C care aveau drept consecință, stoparea sintezei AgHBe, la pacienți cu infecții cronice și ADN/VHB prezent. De atunci, mai mulți autori au raportat circulația acestor tulpini în zone diferite. Într-un studiu din 1996, am demonstrat pentru prima dată în România circulația acestor tulpini, folosind tehnica secvențierii ADN/VHB; 2 dintre cele 4 tulpini testate au fost sălbatice, iar două au prezentat mutații: una dintre ele, negativă pentru AgHBe, provenea de la un copil cu hepatită cronică activă (HCA) și prezenta o mutație în poziția 1896 (G era înlocuită cu A), rezultând codonul „stop” (TAG) descris în literatură. În acest studiu, efectuat în Laboratorul de Biologie Moleculară al Royal Free Hospital din Londra, cea de-a doua probă analizată, provenea de la un copil de 6 ani cu HCA, era AgHBe negativă și prezenta o mutație în poziția 1938 (codonul GTG, înlocuit cu GAG, deci va-

tation from nt 1896 as clinical consequences (chronic severe evolution in parallel with HBeAb and DNA/HBV positive). This study was the first one in Romania that described Mediterranean strains circulation in our region. This strain was also described in China and USA, but the HBV genotypes are different (in the Mediterranean region and China, genotypes B, C and D are predominant, and A genotype in North USA and North Europe). From previous studies using samples from Romanian patients (from 130, and 10 patients, respectively) we know that major HBV genotype in our country is D, alone or in association with A type. The final role of HBV genome sequence analysis is in correlation with patient's prognostic (different evolution according with infected genotype) and therapeutic strategies (patients positive for HBeAg will be treated until HBe seroconversion, and for negative patients, the treatment endpoint will be dictated by permanent DNA/HBV suppression and normal biochemical profile). In this context future studies are necessary, if possible, for all patients with severe chronic HBV infections, in order to select them correctly and to demonstrate the virus elimination using biological molecular techniques.

Keywords: HBV, genotype, precore/core mutation, chronic diseases.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S *et al.* (1989) Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*, 2 (8663): 588-91.
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH *et al.* (2003) Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology*, 125: 444-51.
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH *et al.* (2003) Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology*, 38: 619-28.
- Constantinescu I, Nedelcu F, Toader MA, Daniela V (2008) Clinical and therapeutical importance of HBV genotyping in Romania. *J Med Life*, 1(2): 165-73.
- Drugan C, Bricher S, Muntean M *et al.* (2008) Genotype of Hepatitis B Virus in Romanian Patients. *Appl Med Info*, 22(1-2): 55-61.
- Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA (1983) Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology*, 3: 656-62.
- <http://ami.info.umfcluj.ro/index.php/AMI/article/view/119>
- Iancu LS, Ling R, Moraru E *et al.* (2000) Hepatitis B virus precore sequences in Romanian children with chronic infections. *Rev Med Chi rSoc Med Nat.*, 104(1): 113-123.
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. (1997) Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis*, 175: 1285-93.

lina înlocuită cu acidul glutamic), printre alte mutații (nt: 1961, 1966 și 1969), care aveau aceeași consecință clinică ca și mutația din poziția 1986 (hepatită cronică severă, absența AgHBe și prezența ADN/VHB). Tulpinile mediteraneene au fost descrise și în China și SUA, dar genotipurile VHB sunt diferite: în zona Mediteranei și China, predomină genotipurile, B, C și D, iar în nordul SUA și al Europei, genotipul. Studii anterioare efectuate în țara noastră pe loturi restrânse (de 130, respectiv 10 pacienți) au evidențiat că genotipul predominant circulant este D, singur sau în asociere cu genotipul A. Importanța cunoașterii genotipului, în paralel cu evidențierea tulpinilor mediteraneene, este legată de prognostic (evoluții diferite în funcție de genotip) și de tratament (pacienții AgHBe pozitivi sunt tratați până la apariția anti-HBe, iar cei AgHBe negativ, până la demonstrarea debarasării de virus, prin tehnici de biologie moleculară, în paralel cu normalizarea testelor biochimice). Plecând de la aceste considerente, devine evidentă necesitatea unor studii viitoare, lărgite, care să cuprindă, pe cât posibil, toți pacienții cu infecții VHB cronice severe, în vederea selectării corecte a loturilor pentru tratament și obiectivarea vindecării, prin studii de biologie moleculară.

Cuvinte cheie: VHB, genotip, mutații preC/C, boli cronice.

5. VIRULENCE FACTORS OF PERIODONTAL PATHOGENS / FACTORI DE VIRULENȚĂ AI PATOGENILOR PARODONTALI

Cătălina Suzana Stîngu

Institute for Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University of Leipzig, Germany /
Institutul de Microbiologie Medicală și Epidemiologie a Bolilor Infecțioase, Universitatea din Leipzig, Germania

Considerable effort over the past few decades focused on identifying the periodontal pathogens. According to the Koch's postulates adapted from Socransky, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* are most likely, among other bacteria, to be considered periodontal pathogens.

Their virulence is complex and multifactorial. The microorganisms have multiple ways in which they can participate in the etiology of periodontal disease. For example, *P. gingivalis* produces a large spectrum of proteases (R and K gingipains, arginine- and lysine specific cysteine proteases) which impair the tissue integrity and fight against the host defense. Its binding to receptors on host cells with subsequent colonization may be mediated by hemagglutinins, lipopolysaccharide and fimbriae. Recently, six polysaccharide capsular serotypes have been described in *P. gingivalis*. Highly encapsulated strains reduce phagocytosis and therefore are considered to be an important virulence factor.

A. actinomycetemcomitans produces leucotoxin (probably the most studied virulent factor), cytotoxins which induce apoptosis in human immune cells. The lipopolysaccharide, Fc-binding proteins, membranous vesicles, extracellular amorphous material and fimbriae play an important role in adhesion and invasion of epithelial cells.

This long list of virulence factors is also the consequence of the fact that these two bacteria are amongst the most widely studied among a growing number of candidate pathogens. In contrast we know little about the virulence factors of other two important periodontal pathogens: *T. denticola* and *T. forsythia*.

Keywords: Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Armitage CG. (2010) Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology* 2000, 53: 70-88.
- Bostanci N, Belibasakis G. (2012) *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Letters*, 333: 1-9.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: a triple A periodontopathogen? *Periodontology* 2000, 54: 78-105.
- Socransky SS. (1977) Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol*, 48(9): 497-504.

În ultimele decenii s-au făcut eforturi deosebite pentru identificarea patogenilor parodontali. Conform postulatelor lui Koch adaptate de Socransky, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* și *Tannerella forsythia* pot fi, alături de alte bacterii, considerate patogeni parodontali. Virulența lor este complexă și multifactorială.

P. gingivalis produce diferite proteaze (gingipain K și R, cistein proteaze arginin și lizin specifice) ce afectează integritatea tisulară și au rol în eludarea sistemului imun al gazdei. Aderarea la receptorii celulari urmată de colonizare poate fi mediată de hemaglutinine, lipopolizaharid și fimbrii. Recent au fost descrise la *P. gingivalis* 6 serotipuri capsulare. Tulpinile capsulate reduc fagocitoza, capsula fiind de aceea considerată un important factor patogen.

A. actinomycetemcomitans produce leucotoxine (probabil cel mai studiat factor de virulență), citotoxine ce induc apoptoza în celulele imune umane. Lipopolizaharidul, proteinele de legare Fc, veziculele membranare, materialul extracelular amorf și fimbriile joacă un rol important în adeziune și invadarea celulelor epiteliale.

Numărul mare al factorilor de virulență prezenți la aceste două bacterii este și consecința faptului că dintre numărul mereu în creștere al potențialilor patogeni parodontali, *P. gingivalis* și *A. actinomycetemcomitans* sunt de departe cele mai studiate. Nu trebuie însă neglijate și alte bacterii (*T. denticola*, *T. forsythia*) despre ai căror factori de virulență știm deocamdată mai puțin.

Cuvinte cheie: Parodontită, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

6. VIRULENT METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND INFLUENZA VIRUS – THE KILLING COUPLE / UN CUPLU UCIGAȘ: STAPHYLOCOCCUS AUREUS VIRULENT, REZISTENT LA METICILINĂ ȘI VIRUSUL GRIPAL

Irina Codiță

Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology; Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Chair of Microbiology, Bucharest / Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Microbiologie și Imunologie Cantacuzino; Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, Catedra de microbiologie

It is currently accepted that „Polymicrobial interactions on mucosal surfaces can influence inflammation, immunity, and disease outcome”. Influenza co-infection with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) has prompted particular interest in the USA during the last years. According to CDC Health Alert Network, “From October 1, 2006 through September 30, 2007, 73 deaths from influenza in children were reported to CDC from 39 state health departments and two city health departments; from these, 30 (44%) had a bacterial co-infection, and 22 (73%) of these 30 were infected with *Staphylococcus aureus*”.

Community Methicillin Resistant *S. aureus* (C-MRSA) is of particular concern, because such kind of strains (e.g. USA300) have been recently found to spread both in community and in hospitals, not only in the USA, but also in Western European countries. Recent European harmonized molecular studies (SeqEU.Net) coordinated at the national level by Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology, Bucharest, Romania, detected invasive *t008* MRSA strains in a Western county Romanian hospital, resembling USA300 strain (3) and a community *t044* strain involved in an influenza – MRSA lethal case. These strains were found to elaborate an exocellular enzyme, Panton-Valentine Leucocidine (PVL), which is responsible for necrotizing pneumonia and for affecting the neutrophil function, resulting in higher susceptibility to infection.

Influenza virus and *Staphylococcus aureus* are facilitating each other to provoke severe respiratory tract infections. Experimental findings confirmed by molecular tests are supporting a physiopathological model combining protease enzymatic mechanisms, resulting in local epi-

Este recunoscut în prezent că „interacțiunile polimicrobiene la suprafața mucoaselor pot influența inflamația, imunitatea și evoluția bolii”.

Co-infecția virus gripal - *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a trezit un interes particular în SUA în ultimii ani, deoarece după semnalările Rețelei de alertă în domeniul Sănătății a CDC, „Din 1 octombrie 2006 până în 30 septembrie 2007 au fost raportate 73 de decese prin gripă la copii, de către 39 departamente pentru sănătate din 39 de state și două departamente orășenești; dintre cazurile letale 30 (44%) au avut o coinfecție bacteriană, iar 22 (73%) din aceste 30 de cazuri fuseseră infectate cu *S. aureus*”.

S. aureus rezistent la meticilină comunitar (C-SARM) este un motiv particular de îngrijorare, deoarece acest tip de tulpini, cum este de exemplu tulpina USA300, s-au dovedit capabile să se răspândească atât în comunitate, cât și în mediul de spital, nu numai în SUA, dar și în țări din Europa de Vest. Studii moleculare recente, armonizate la nivel european, (SeqEU.Net), coordonate la nivel național de INCDMI Cantacuzino, București, România, au detectat tulpini invazive de SARM de tip *spa t008* asemănătoare tulpinii USA300 într-un spital dintr-un județ din vestul României și o tulpină comunitară de tip *spa t044* implicată într-un caz letal de gripă complicată cu infecție cu SARM. La aceste tulpini s-a detectat gena care codifică pentru elaborarea unei enzime extracelulare, Leucocidina Panton-Valentine (LPV), responsabilă pentru pneumonia necrotizantă și afectarea funcției neutrofilului, care are ca rezultat o susceptibilitate mai mare la infecție.

Virusul gripal și *S. aureus* se potențează unul pe altul în producerea de infecții severe de tract respirator. Constatări experimentale confirmate prin teste moleculare susțin un model fiziopatologic în care mecanismele enzimatic proteazice, având ca efect amplificarea leziunilor

thelial damage amplification, with immune response changes, including overproduction of proinflammatory cytokines. The HA protein (Haemagglutinin) involved in viral attachment is synthesized as an HA0 precursor which is required to be cleaved by host and/or bacterial proteases for productive infection. In 2010, patients with hyper IgE syndrome, who often present with *S. aureus* infections of the lung and skin, were reported to have mutations in STAT3, a transcription factor required for TH17 immunity.

Effective treatment for PVL positive MRSA pneumonia was demonstrated to be different from non PVL positive infections. Enzyme inhibitor capacities of recommended antimicrobials seem to be crucial for good clinical results. Prescribing of antimicrobials considered to be very effective on MRSA, as Vancomycin in severe pneumonia with PVL positive MRSA remained ineffective.

Further comparative, alternative and cumulative laboratory studies on influenza virus - *S. aureus* fellowship established *in vitro* and/or during the host attack may result in better laboratory diagnostic algorithms for influenza confirmed cases, in improved rates of virus recovery from patients samples and new laboratory methods to rapidly detect PVL positive *S. aureus* associated with influenza infection. Meantime, better knowledge on influenza - *Staphylococcus aureus* respiratory coinfections may lead to more effective therapeutical alternatives.

Keywords: influenza, *Staphylococcus aureus*, co-infection.

epiteliale locale, se combină cu modificarea răspunsului imun, inclusiv prin producerea în exces de citokine proinflamatorii. Proteina HA (hemaaglutinina), implicată în atașamentul viral, este sintetizată ca precursor HAO, care va trebui să fie clivat de către proteazele gazdei sau cele bacteriene pentru ca infecția să devină productivă. În 2010, s-a raportat că pacienții cu sindrom de hiperimunoglobulinemie E, care se prezintă adesea cu infecții cu *S. aureus* la nivelul plămânilor și al pielii, au mutații la nivelul STAT3, un factor de transcriere necesar pentru imunitatea TH17.

S-a dovedit că tratamentul eficient al pneumoniei cu SARM LPV pozitiv este diferit de cel al infecțiilor cu SARM LPV negativ. Capacitatea de a inhiba enzima antibioticelor recomandate pare să fie crucială pentru obținerea rezultatelor clinice satisfăcătoare. Prescrierea unor antibiotice considerate a fi foarte eficiente asupra SARM, cum este vancomicina, în pneumonia severă cu SARM LPV pozitiv, s-a dovedit ineficientă.

Studii de laborator aprofundate asupra asocierii virus gripal - *S. aureus* stabilite *in vitro* și/sau în timpul atacului gazdei pot conduce la obținerea unor algoritmi de diagnostic mai buni pentru cazurile confirmate de gripă, la rate superioare de recuperare a virusului din prelevatele provenite de la pacienți și la noi metode de laborator pentru detectarea rapidă a suprainfecției cu SARM LPV pozitiv în infecția gripală. În același timp, mai buna cunoaștere a coinfecțiilor respiratorii virus gripal - *S. aureus* poate conduce la găsirea unor alternative terapeutice mai eficiente.

Cuvinte cheie: gripă, *Staphylococcus aureus*, co-infecție.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Alcorn J, Kudva A, Crowe CR, Scheller EV, Kolls JK (2010) Influenza A inhibits TH17-mediated immunity which is required for host defense against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 181: A5085.
- Beadling C, Slifka MK (2004) How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Curr Opin Immunol*, 17: 185-191.
- Codiță I *et al.* (2008) Panton Valentine Leukocidin pozitive, *t008 spa*-type Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a Western county Romanian hospital – accepted for publication to the XVIIIth European Conference of Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, April, 2008.
- Lijek RS, Weiser JN (2012) Co-infection subverts mucosal immunity in the upper respiratory tract. *Curr Opin Immunol*, 24(4): 417-23.
- Micek ST, Dunne M, Kollef MH (2005) Pleuropulmonary complications of Pantone-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest*, 128: 2732-2738.
- ***CDC (2008) Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices [ACIP]. *MMWR*, 57, [No. RR-7], 1-60. www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5707a1.htm.

7. VIRULENCE FACTORS OF COMMUNITY AND HOSPITAL ASSOCIATED METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS / FACTORI DE VIRULENȚĂ ASOCIAȚI TULPINILOR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-REZISTENTE COMUNITARE ȘI SPITALICEȘTI

Székely Edit^{1,2}, Molnár Szabolcs², Vas Krisztina Eszter^{1,2}, Szócs-Gazdi Uzonka³, Doina Bilca², Lőrinczi Lilla¹

¹University of Medicine and Pharmacy Târgu Mureș; ²Emergency Clinical Hospital Târgu Mureș;

³Municipal Hospital Odorheiu-Secuiesc / ¹Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu Mureș;

²Spitalul Clinic Județean de Urgență Târgu Mureș; ³Spitalul Municipal Odorheiu-Secuiesc

S. aureus became an important human pathogen also due to its rich enzymatic and toxic equipment. Their expression levels and complex interactions between various regulatory genes determine strain virulence and influence the outcome of host-microbe interaction. The virulence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains is different depending on their genetic background. We intend to present these differences in relation to a collection of community- and hospital-associated MRSA strains characterized by *spa*, *SCCmec*, *agr* typing and toxin profile.

Keywords: Panton-Valentine leukocidin, staphylococcal superantigens, enterotoxins, molecular characterization.

S. aureus a devenit un patogen uman redutabil printre altele și datorită pachetului bogat enzymatic și de toxine. Nivelul de expresie al acestora și interacțiunile complexe dintre diverse gene reglatoare determină virulența tulpinilor și influențează rezultatul relației microorganism-gază. În cazul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistente (MRSA) există diferențe în potențialul virulent în funcție de fundalul genetic. Ne propunem prezentarea acestora în contextul unei colecții de tulpini MRSA spitalicești și comunitare, caracterizate molecular prin tipizare *spa*, *SCCmec*, *agr* și prin determinarea prezenței genelor ce codifică exotoxine.

Cuvinte cheie: leucocidina Panton-Valentine, superantigene stafilococice, enterotoxine, caracterizare moleculară.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Diep BA, Sensagaugh GF, Somboona NS *et al.* (2004) Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. *J Clin Microbiol*, 42: 2080-2084.
- Holtfreter S, Grumann D, Schmutde M *et al.* (2007) Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45(8): 2669-80.
- Rudkin J, Edwards AM, Bowdren MG *et al.* (2012) Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. *J Infect Dis*, 205: 798–806.
- Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N *et al.* (2009) Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. *Appl Environ Microbiol*, 75: 6839-6849.

Session 3 – Microbial Virulence and Mechanisms of Pathogenicity (2) Sesiunea 3 - Virulența microbiană și mecanisme de patogenitate (2)

8. FROM A VIRULENCE FACTOR TO A RAPID ELUCIDATION OF A MULTINATIONAL FOOD-BORNE OUTBREAK WITH *LISTERIA MONOCYTOGENES* / DE LA UN FACTOR DE VIRULENȚĂ LA ELUCIDAREA RAPIDĂ A UNUI FOCAR INTERNAȚIONAL DE TOXIINFECȚIE ALIMENTARĂ CU *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Steliana Huhulescu, Ulrich Sagel, Werner Ruppitsch, Anna Stöger, Franz Allerberger, Ariane Pietzka

Austrian Agency for Health and Food Safety, Viena / Agenția Austriacă pentru Sănătate și Siguranță Alimentară, Viena

Manifest listeriosis is a rare, predominantly food-borne disease in Austria that has a high lethality. Mainly immunocompromised persons and pregnant women are prone for manifest disease. Listeriosis has one of the highest case-fatality rates among food-borne infectious diseases (20-30%). Traditional detection of food-borne outbreaks relies on a more than expected accumulation of cases by time and space. Case numbers often are sufficient to conduct case-control or cohort studies successfully. In listeriosis outbreaks these concepts may fail. Recently, it attracted much public attention due to an international outbreak caused by a cheese product made in Austria.

Molecular surveillance of listeria strains tested in the Binational Consiliary Laboratory for Listeria Austria/Germany discovered in 2009 a new PFGE pattern in *L. monocytogenes* isolates serotype 1/2a in a multi-national outbreak of invasive listeriosis due to contaminated acid curd cheese sold by supermarkets. The product carried two genetically different outbreak strains that were responsible for 34 cases of bacteriologically proved invasive listeriosis (25 cases in Austria, eight in Germany and one in the Czech Republic), eight of them with fatal outcome (five in Austria and three in Germany).

Onset of disease ranged from June 2009 until end of February 2010. Just analysing the occurrence of clinical listeriosis by time and space would have missed the outbreak.

Because current typing techniques are time-consuming, cost-intensive, technically demanding,

Listerioza este o maladie infecțioasă rară în Austria, dar deosebit de severă, predominant de origine alimentară, însoțită de una dintre cele mai crescute letalități în rândul toxiinfecțiilor alimentare (20-30%). Metoda tradițională de detectare a focarelor de toxiinfecție alimentară se bazează pe acumularea imprevizibilă de cazuri în timp și spațiu. De cele mai multe ori numărul cazurilor este o informație suficientă pentru a asigura desfășurarea cu succes a unei anchete epidemiologice (caz-control sau studii de cohortă). În cazul focarelor de listerioză, aceste concepte pot eșua. Recent, atenția publicului a fost atrasă din cauza unui focar multinațional cauzat de un produs de brânză fabricat în Austria. Supravegherea molecular-epidemiologică a tulpinilor de *L. monocytogenes* colectate în laboratorul consiliar binațional pentru Listeria Austria / Germania din Viena a evidențiat în 2009 un nou model PFGE de *L. monocytogenes* serovar 1/2a, serotip implicat într-un focar multinațional de listerioză cauzat de consumul unei brânze de vaci din lapte acidulat, vândută în supermarketuri. Produsul a conținut două tulpini bacteriene distincte genetic, ambele responsabile pentru 34 de cazuri de listerioză invazivă confirmată bacteriologic (25 de cazuri din Austria, opt în Germania și unul în Republica Cehă), opt dintre ele cu evoluție letală (cinci în Austria și trei în Germania). Debutul bolii a variat din iunie 2009 până la sfârșitul lunii februarie 2010. O anchetă epidemiologică bazată doar pe factorii timp și spațiu nu ar fi condus la elucidarea focarului de infecție. Deoarece tehnicile analitice actuale necesită

and difficult to standardize, we developed a rapid and cost-effective method for typing of *L. monocytogenes*. A 500-bp fragment located in the virulence gene internalin B (inlB) was amplified for subsequent HRM analysis using the forward primer inlB-forward (5-CATGGGAGAGTAACCCAACC-3) and the reverse primer inlBreverse (5-GCGGTAACCCCTTTGTCATA-3). Pietzka *et al.* typed 192 *L. monocytogenes* isolates (172 clinical isolates and 20 isolates from culture collections) by high-resolution melting (HRM) curve analysis of a specific locus of the internalin B gene (inlB). All obtained HRM curve profiles were verified by sequence analysis. The 192 tested *L. monocytogenes* isolates yielded 15 specific HRM curve profiles. Sequence analysis revealed that these 15 HRM curve profiles correspond to 18 distinct inlB sequence types. The HRM curve profiles obtained correlated with the five phylogenetic groups I.1, I.2, II.1, II.2, and III. For all samples belonging to the outbreaks the inlB HRM-PCR products were subsequently sequenced for verification. Retrospectively, we studied performance of serotyping and HRM-PCR inlB sequence-type (inlB) analysis to detect these outbreaks that have been confirmed by PFGE. All 12 Austrian isolates of clone 1 of outbreak were serotype 1/2a and inlB 15, and all 13 Austrian isolates of clone 2 were serotype 1/2a and inlB 9.

HRM-PCR analysis appears to be a sensitive, fast and inexpensive screening method to discover possible outbreaks. This method provides a rapid and powerful screening tool for simultaneous preliminary typing of up to 384 samples in approximately 2 hours. In our study, it better distinguished outbreak clones from unrelated strains than serotyping, but it still requires confirmation by more discriminatory methods like PFGE.

Keywords: listeriosis, food-borne outbreak, internalin B, high resolution melting curve analysis, screening tool.

mult timp, sunt costisitoare, dificile din punct de vedere tehnic și greu de standardizat, am dezvoltat o metodă rapidă și economică pentru tipizarea *L. monocytogenes*. Un fragment de 500 pb situat în gena codificatoare a factorului de virulență internalina B (inlB) a fost amplificat pentru analiza ulterioară (HRM: high resolution melting) cu ajutorul unui inlB-forward primer (5-CATGGGAGAGTAACCCAACC-3) și inlB-reverse (5-GCGGTAACCCCTTTGTCATA-3). Pietzka și colaboratorii au testat 192 tulpini de *L. monocytogenes* (172 tulpini clinice și 20 de tulpini din colecția de tulpini) prin metoda analizei curbelor de topire (HRM) a produselor PCR. Toate profilurile HRM obținute au fost verificate prin analize secvențiale. Cele 192 de tulpini de *L. monocytogenes* testate au furnizat 15 profiluri specifice HRM. Analiza secvențială a relevat faptul că aceste 15 profiluri HRM corespund la 18 tipuri distincte de secvențe de inlB. Profilurile HRM corelează cu cele 5 grupuri filogenetice I.1, I.2, II.1, II.2 și III. Toate probele aparținând focarului de listerioză menționat au fost supuse ambelor analize (HRM și secvențiere). Retrospectiv, am studiat performanța serotipării și a metodei HRM-PCR în detectarea focarului confirmat prin metoda standard – PFGE la tulpinile din Austria. Toate cele 12 tulpini de clonă 1 din focar au fost serotipul 1/2a și inlB 15 și toate cele 13 tulpini de clonă 2 au fost serotipul 1/2a și inlB 9. Metoda HRM-PCR pare a fi o metodă de screening sensibilă, ieftină și rapidă pentru a descoperi posibile focare. Această metodă oferă un instrument de screening rapid și performant pentru testarea preliminară simultană a până la 384 de probe în aproximativ 2 ore. În studiul nostru, a distins cele două clone implicate în focar mai bine decât serotiparea, dar necesită în continuare confirmare prin metode mai discriminatorii, cum ar fi PFGE.

Cuvinte cheie: listerioză, focar de toxoinfecție alimentară, internalina B, high resolution melting curve analysis, instrument de screening.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P *et al.* (2010) Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro Surveill* 15 (16). pii: 19543.
- Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Allerberger F, Ruppitsch W. (2011) Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of *Listeria monocytogenes*, *J Mol Diagn*, 13 (1): 57–63.

9. EMERGENT HUMAN LISTERIOSIS IN ROMANIA / LISTERIOZA UMANĂ EMERGENTĂ ÎN ROMÂNIA

Dana-Magdalena Caplan¹, Alina-Maria Holban², Marius-Eduard Caplan³, Alina-Maria Borcan⁴

¹Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology, Bucharest; ²University of Bucharest, Faculty of Biology, Bucharest; ³University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest; ⁴Carol Davila University of Medicine, Department of Microbiology, Bucharest / ¹Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino", București; ² - Universitatea București, Facultatea de Biologie, București; ³Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, București; ⁴Universitatea de Medicină „Carol Davila”, Departamentul de Microbiologie, București

Listeria monocytogenes is an emergent food-borne pathogen in Romania for the last 15-20 years, causing severe infections, mainly in high-risk groups of patients. During 2000 - July 2012, a number of 16 *L. monocytogenes* strains were investigated in the NRC for Zoonosis of Cantacuzino Institute: 14 strains *L. monocytogenes* 1a (serotype most circulating in Romania) isolated from patients with meningitis, meningoencephalitis and septicemia (one death), and two strains *L. monocytogenes* 4b causing neonatal listeriosis and abortive disease. These strains have been studied for the adherence and invasion of HeLa cells, for the production of enzymatic virulence factors and for the antibiotics susceptibility spectrum. All tested strains adhered with high rates, with a predominant diffuse-aggregative pattern, poorly invasive. However, two of them exhibited a higher invasive potential, with modifications in the nucleus (condensations, fragmentation) and cytoplasm alterations characteristic for apoptotic cells. From the soluble virulence factors, these clinical strains showed production of hemolysin, lecithinase, gelatinase, amylase, caseinase, DN-ase; lipase was absent. Antibiotics susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method. All tested strains revealed natural resistance *in vivo* to cephalosporins, resistance to older quinolones, and one of them was resistant to aminopenicillin.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, invasive infections, virulence, antibiotics susceptibility.

Listeria monocytogenes, germen condiționat-patogen, cu transmitere alimentară, emergent în ultimii 15-20 de ani în România, determină apariția unor infecții severe, mai ales la pacienții aflați în grupe de risc. În perioada 2000 – iulie 2012, au fost investigate, la nivelul CNR pentru Zoonoze din Institutul Cantacuzino, un număr de 16 tulpini de *L. monocytogenes*: 14 dintre ele au fost *L. monocytogenes* serotip 1a (frecvent circulat în România), tulpini izolate de la pacienți cu meningită, meningoencefalită, septicemie (un deces), iar alte două tulpini au fost *L. monocytogenes* serovar 4b, care au determinat listerioză neonatală și boală abortivă. Tulpinile au fost studiate atât în ceea ce privește capacitatea de aderență și invazie asupra celulelor HeLa, pentru producția de factori de virulență enzimatici, cât și privind spectrul de antibiosensibilitate. Toate tulpinile testate au aderat cu o rată înaltă, având un *pattern* predominant difuz-agregativ și slab invaziv. Totuși, două dintre tulpini au evidențiat un înalt potențial invaziv, cu modificări la nivelul nucleului (condensări, fragmentare), precum și alterări la nivelul citoplasmei, caracteristice celulelor apoptotice. În ceea ce privește factorii solubili de virulență, aceste tulpini de proveniență clinică au evidențiat producerea hemolizinei, lecitinazei, gelatinazei, amilazei, cazeinazei, DN-azei; lipaza a fost absentă. Testele de sensibilitate la antibiotice au fost efectuate utilizând metoda difuzimetrică Kirby-Bauer. Toate tulpinile testate au relevat rezistența naturală *in vivo* la cefalosporine, rezistența la quinolone de generație mai veche, iar una dintre tulpini a fost rezistentă la aminopeniciline.

Cuvinte cheie: *Listeria monocytogenes*, infecții invazive, virulență, antibiosensibilitatea.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Lazăr V (2003) Microbial adherence. Romanian Academy Press, Bucharest, pp.148-170.
Liu D (2008) Laboratory determination of *Listeria monocytogenes* virulence, *SciTopics* (Retrieved from <http://www.scitopics.com>).
Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A (2010) Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2728-2731.

10. ACINETOBACTER BAUMANNII VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA: VIRULENCE SOLUBLE FACTORS AND ANTIBIORESISTANCE HALLMARKS / FACTORII DE VIRULENȚĂ SOLUBILI ȘI REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE LA TULPINI DE ACINETOBACTER BAUMANNII IMPLICATE ÎN PNEUMONIA DE VENTILATOR

Elvira Borcan¹, Camelia Mihaela Ghiță¹, Veronica Lazăr²

¹Fundeni Cincal Institute, Bacteriology Laboratory, Bucharest; ²University of Bucharest, Faculty of Biology /
¹Institutul Clinic Fundeni, Laboratorul de Bacteriologie, București; ²Universitatea București, Facultatea de Biologie

Introduction. Long time considered an opportunistic pathogen involved in infections of moderate severity, *Acinetobacter (A) baumannii* is now recognized as a redutable nosocomial pathogen, ventilator-associated pneumonia (VAP) being one of the most prevalent nosocomial infections. Increased frequency of isolation, the emergence of a growing number of strains with multiple antibiotic resistance and lack of effective therapy against these strains, led to the reevaluation of *A. baumannii* status as an opportunist pathogen.

The aim of this study was to determine the etiological agents of VAP in ICU Fundeni Institute and the expression of soluble virulence factors and antibiotic resistance profiles in *Acinetobacter* strains involved in VAP.

Material and methods. Gram negative strains isolated from tracheal aspirates were identified by BD Phoenix system. For 61 strains of *A. baumannii*, there was investigated the production of 8 soluble, enzymatic factors (haemolysins and other pore-forming toxins, DNA-ase, amylase, esculin hydrolysis and proteases activity), by inoculation of enriched culture media containing specific biochemical substrata. The antibiotic susceptibility testing was performed for 202 strains, by disc diffusion method (Oxoid disks) and the production of metallo- β -lactamase (MBL) was assessed by the E-test method (AB Biodisk, Solna).

Results. *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* proved to be the main etiological agents in VAP, *A. baumannii* being isolated with increased frequency compared to other species. The analysis of phenotypic enzymatic tests revealed a low production of soluble virulence factors. The most frequent enzymes involved in the pathogenicity of *Acinetobacter* were lipase (74%) and lecithinase (62%). Only 18% of these strains were

Introducere. Considerat multă vreme un patogen oportunist implicat în infecții de severitate moderată, *Acinetobacter (A) baumannii* este recunoscut astăzi ca un patogen nosocomial redutabil, pneumonia de ventilator (VAP) fiind una dintre cele mai prevalente infecții nosocomiale. Izolarea sa cu frecvență crescută, apariția unui număr tot mai mare de tulpini cu rezistență multiplă la antibiotice, precum și lipsa mijloacelor terapeutice eficiente împotriva acestor tulpini, a determinat reevaluarea statutului de patogen oportunist al *A. baumannii*.

Scopul acestui studiu a fost stabilirea agenților etiologici ai VAP, în secția de Terapie Intensivă a Institutului Clinic Fundeni, precum și investigarea profilului unor factori de virulență solubili și a rezistenței la antibiotice la tulpinile de *A. baumannii* implicate în pneumonia de ventilator.

Materiale și metode. Tulpinile de bacili Gram negativi izolate din aspiratele traheale ale pacienților cu VAP au fost identificate cu ajutorul automatului BD Phoenix. Pentru 61 de tulpini de *A. baumannii* s-a studiat profilul a 8 factori de virulență enzimatici solubili, prin cultivarea acestor tulpini pe medii de cultură cu substrat încorporat, corespunzător fiecărui factor de virulență: hemolizine și alte toxine formatoare de pori, DN-aza, amilaza, hidroliza esculinei și proteaze. Pentru 202 tulpini de *A. baumannii* s-a analizat profilul de antibioretistență, prin metoda difuzimetrică (discuri Oxoid), iar detectarea producerii de metalo- β -lactamaze (MBL) s-a realizat prin metoda E-test (AB Biodisk, Solna).

Rezultate și discuții. *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Klebsiella pneumoniae* au reprezentat principalii agenți etiologici ai pneumoniei de ventilator, *A. baumannii* fiind izolat cu o frecvență crescută față de celelalte specii. Analiza testelor fenotipice a evidențiat o producție redusă a factorilor de virulență solubili, principalele enzime implicate în patogenitatea tulpinilor de *Acinetobacter* fiind lipaza (74%) și lecitinaza (62%). Numai 8% dintre tulpinile de *A. baumannii* au fost sensibile la toate antibioticele

susceptible to all tested antibiotics, the results showing a high number of strains with multiple resistance with a high rate of panresistance (34%), with susceptibility only to colistin. The highest rate of resistance was in β -lactam antibiotics: 75% to piperacillin/tazobactam and over 90% resistance to ticarcillin, ceftazidime and imipenem. For these strains an increased rate of resistance to quinolones and gentamicin was observed, 83% of the strains being MBL producers.

Conclusions. *A. baumannii* was the main etiologic agent in VAP in ICU Fundeni Institute. The results of this study, confirm other data in the literature, showing that *A. baumannii* exhibit low virulence, clinical isolates being implicated in colonization rather than in infection. Considering the multiple antibiotic resistance, identifying factors involved in virulence may be useful in differentiating the colonizing strains from those of low or high virulence potential. The main feature of virulence of *Acinetobacter* strains still remains its multiresistance, much more important than other possible virulence factors.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, VAP, multiresistance, MBL, soluble virulence factors, colonization/infection.

testate, rezultatele obținute arătând un număr ridicat de tulpini cu rezistență multiplă la antibiotice, în timp ce 34% dintre acestea au fost sensibile exclusiv la colimicine. Cea mai mare rezistență a fost observată la antibioticele β -lactamice (peste 75% la piperacilină/tazobactam și peste 90% rezistență la ticarcilină, ceftazidim și imipenem). Pentru aceste tulpini s-a înregistrat o creștere a rezistenței la quinolone și gentamicină. Pentru tulpinile rezistente sau intermediare la imipenem s-a analizat producția de β -lactamaze, 83% dintre acestea fiind producătoare.

Concluzii. *A. baumannii* a reprezentat principalul agent etiologic izolat din aspiratele traheale ale pacienților cu VAP. Rezultatele obținute în cadrul prezentului studiu confirmă alte date din literatură, care arată că *A. baumannii* manifestă virulență scăzută, izolatele clinice fiind considerate mai degrabă colonizări decât infecții. Având în vedere rezistența multiplă la antibiotice, identificarea factorilor implicați în virulență ar putea fi utilă în diferențierea tulpinilor colonizatoare de cele cu potențial de virulență scăzut sau ridicat. Principala caracteristică de virulență a tulpinilor de *Acinetobacter* implicate în VAP rămâne astfel multirezistența, mult mai importantă decât alți factori posibili de virulență.

Cuvinte cheie: *Acinetobacter baumannii*, VAP, multirezistență, MBL, factori de virulență solubili, colonizare/infecție.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- De Rosa F, Craven DE. (2003) Ventilator-Associated pneumonia: Current Management Strategies. Cliggott publishing, Division of CMP Healthcare Media.
- Espinal P, Ignasi R, Vila J. (2011) Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-Baumannii *Acinetobacter*. *Future Microbiology*, 6(5): 495-511.
- Falagas ME, Karveli EA. (2007) The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clin Microbiol Infect*, 13: 117-119.
- Fujimura S *et al.* (2007) Relationship between the usage of carbapenem antibiotics and the incidence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*, 13(3): 147-50.
- Lazăr Veronica (2007) Microbiologie medicală. Ed. Univ. București.
- Landman D, Bratu S, Kochar S *et al.* (2007) Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumonia* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*, 60: 78-82.
- Peleg A, Seifert H, Paterson D. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21: 538-582.
- Richet H, Fournier PE. (2006) Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27(7): 645-646.
- Sato K, Nakae T. (1991) Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 28(1): 35-45.
- Shaw MJ. (2005) Ventilator-Associated Pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*, 11(3): 236-241.
- Stephens C, Francis SJ, Abell V, Dipersio JR, Wells P. (2007) Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. *Am J Infect Control*, 35: 212-5.
- Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis L. (2007) Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections mortality rate and length of hospitalization. *Emerg Infect Dis*, 13(1): 97-103.
- Toma Săcărea, F. (2006) Bacteriologie Medicală, University Press, Târgu Mureș.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 18: 306-25.

11. PHENOTYPIC AND GENOTYPIC STUDY OF VIRULENCE AND RESISTANCE FEATURES IN FOOD BORNE BACTERIA / STUDIUL FENOTIPIC ȘI GENOTIPIC AL FACTORILOR DE VIRULENȚĂ ȘI AL MECANISMELOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE LA TULPINI BACTERIENE IZOLATE DIN PRODUSE ALIMENTARE

Andreea Lorena Mateescu¹, Mariana Carmen Chifiriuc¹, Mihaela Magdalena Mitache²,
Luminița Măruțescu¹, Tatiana Vassu Dimov¹

¹Faculty of Biology, University of Bucharest; ²Public Health Department, Bucharest /

¹Facultatea de Biologie, Universitatea din București; ²DSP București

Introduction: The aim of this study is the investigation of virulence and resistance features in bacterial strains isolated from different food products.

Material and methods: Bacterial strains were isolated and identified according to the latest ISO standards concerning food safety. Expression of soluble enzymatic factors implicated in virulence was performed by spotting the fresh cultures on specific media. Adherence to eukaryotic cells assay was performed using the Cravioto's adapted method, and the biofilm development on the inert substratum by slime production assay. Antibiotic susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer disk diffusion method (CLSI, 2010). The detection of virulence and resistance genes was carried out by PCR.

Results: Bacterial strains belonging to *Listeriaceae* and *Enterobacteriaceae* families exhibited different patterns of adhesion to cellular and inert substrate, and the following soluble virulence factors: proteases (caseinase, gelatinase), pore-forming toxins and enzymes (haemolysins, lecithinase, lipase), DN-ase, amylase, esculin hydrolysis. The tested strains showed resistance to beta-lactams, aminoglycosides and tetracyclines. Molecular tests have enabled the highlighting of the genetic support for the virulence and antibiotic resistance factors.

Conclusions: Bacterial strains isolated from food could represent a microbiological risk fac-

Introducere. Scopul acestui studiu a fost investigarea factorilor de virulență și a mecanismelor de rezistență la antibiotice la tulpini bacteriene izolate din diferite produse alimentare.

Materiale și metode. Tulpinile au fost izolate și identificate conform standardelor în vigoare. Studiul unor factori enzimatici solubili de virulență s-a realizat prin însămânțarea pe medii cu substrat specific. Capacitatea de aderență a tulpinilor a fost studiată pe substrat celular reprezentat de celule Hela (metoda Cravioto) și pe substrat inert (testul producerii de *slime*). Sensibilitatea la antibiotice a fost investigată prin metoda difuzimetrică (CLSI, 2011). Evidențierea genelor de virulență și de rezistență s-a realizat prin PCR și multiplex PCR.

Rezultate. Tulpinile bacteriene aparținând genului *Listeria* și familiei *Enterobacteriaceae* au prezentat diferite *pattern*-uri de aderență la substratul celular și inert, iar factorii de virulență solubili au fost reprezentați de: cazeinaza, gelatinaza, β -hemoliza, lecitinaza, lipaza, DN-aza, amilaza și hidroliza esculinei. Tulpinile analizate au prezentat rezistență la β -lactamice, aminoglicozide și tetracicline. Testele la nivel molecular au permis evidențierea suportului genetic al unor factori de virulență și de rezistență la antibiotice.

Concluzii. Bacteriile din alimente pot constitui un factor de risc microbiologic pentru starea de sănătate a consumatorilor, aspect care indică

tor for the consumer's health, indicating the need to investigate the virulence and antibiotics resistance markers in food isolates, besides their identification and quantification.

Keywords: virulence, antibiotic resistance, adherence, *Listeriaceae*, *Enterobacteriaceae*.

necesitatea investigării virulenței și rezistenței la antibiotice la tulpinile izolate.

Cuvinte cheie: virulență, rezistența la antibiotice, aderență, *Listeria*, *Enterobacteriaceae*.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Chakraborty T, Leimeister-Wächter M, Domann E, Hartl M, Goebel W, Nichterlein T, Notermans S. (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene, *J Bacteriol*, 174: 568-574.
- Chiu C-H, Ou JT. (1996) Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR recombination assay, *J Clin Microbiol*, 34(10): 2619–2622.
- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. (1995) Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene, *J Clin Microbiol*, 33: 1375–1377.
- Knöbl T, Tardelli Gomes TA, Midolli Vieira MA, Bottino JA, Piantino Ferreira AJ. (2004) Detection of *pap*, *sfa*, *afa* and *fim* Adhesin-Encoding Operons in Avian Pathogenic *Escherichia coli*, *Intern J Appl Res Vet Med*, 2(2): 135-141.
- Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. (2010) Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 6: 2728–2731.
- Naimi TS, Wicklund JH, Olsen SJ, Krause G, Wells J, Bartkus J.M, Boxrud DJ *et al.* (2003) Concurrent Outbreaks of *Shigella sonnei* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections Associated with Parsley. *Implications for Surveillance and Control of Foodborne Illness*. 66 (4): 535-541.
- Wernars K, Heuvelman K, Notermans S, Domann E, Leimeister-Wächter M, Chakraborty T. (1992) Suitability of the *pifA* Gene, Which Encodes a Regulator of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*, in the Identification of Pathogenic *Listeria* spp., *Appl Environ Microbiol*, 58(2): 765-768.

Session 4 – Antibiotic Sensitivity / Resistance

Sesiunea 4 - Sensibilitate/rezistență la antibiotice

12. PHENOTYPIC AND GENETIC SCREENING OF BETA-LACTAMASES MEDIATED RESISTANCE AMONGST CLINICAL ISOLATES OF GRAM NEGATIVE BACILLI FROM ROMANIAN HOSPITALS / SCREENING-UL FENOTIPIC ȘI GENOTIPIC AL REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICELE B-LACTAMICE LA BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANȚĂ MEDICALĂ

Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc, Luminița Gabriela Măruțescu, Ani Cotar, Otilia Banu, Elvira Borcan, Veronica Lazăr, Grigore Mihaescu

Faculty of Biology, University of Bucharest / Facultatea de Biologie, Universitatea București

The purpose of this study was the investigation of beta-lactams resistance mechanisms in Gram-negative rods (GNR) isolated from intensive care units (ICU).

Material and methods: a number of 531 GNR strains (334 *Enterobacteriaceae* and 197 *Pseudomonadaceae*) were isolated from 1166 positive clinical samples collected from patients hospitalized during 2011, in the ICUs of two big hospital from Bucharest, Romania. Their resistance phenotypes were established using: disk diffusion test, double-disk diffusion test, Modified Hodge Test (MHT) and E-test ESBL, MBL and AmpC. The genetic support of the beta-lactam resistance mediated by enzymatic mechanisms was investigated by simple and multiplex PCR.

Results and discussion: GNRs constituted the most frequent etiology of infections that occurred in hospitalized patients, representing 45.5% from the total number of positive cases. Out of these, 64% of the *Enterobacteriaceae* and 36% of the *Pseudomonadaceae* strains expressed resistance to beta-lactam antibiotics. The extended spectrum beta-lactamases (ESBL) phenotype was present in 35.8%, while the metallo beta-lactamases (MBL) one in 34% of the tested GNR strains. A significant percentage (9.4%) of the tested strains exhibited simultaneously ESBL and MBL profiles. Some of the *En-*

Scopul acestui studiu a fost identificarea diferitelor tipuri de β -lactamaze la baciliile Gram-negativi (BGN) izolați din secțiile de terapie intensivă.

Materiale și metode: În perioada 2008-2011 a fost izolat un număr de 531 tulpini de BGN (334 *Enterobacteriaceae* și 197 *Pseudomonadaceae*) din 1166 probe biologice prelevate de la pacienți spitalizați în secțiile de terapie intensivă din două mari spitale din București. Fenotipurile de rezistență la antibiotice au fost stabilite utilizând metoda disc-difuzimetrică, testul dublei-difuzii (DDST), testul Hodge modificat (MHT) și E-test ESBL, MBL și AmpC. Suportul genetic al rezistenței mediate enzimatic la antibioticele β -lactamice a fost investigat prin PCR simplu și multiplex.

Rezultate și discuții: tulpinile de BGN reprezintă cea mai frecventă cauză a infecțiilor pacienților spitalizați, reprezentând 45,5% din totalul probelor biologice de natură infecțioasă. Dintre acestea, 64% dintre tulpinile de *Enterobacteriaceae* și 36% dintre tulpinile de *Pseudomonadaceae* prezintă rezistență la antibioticele β -lactamice. Beta-lactamazele cu spectru extins (BLSE) au fost întâlnite la 35,8% dintre tulpini, iar MBL la 34% dintre tulpinile testate. Un procent semnificativ (9,4%) dintre tulpinile testate au prezentat simultan fenotipurile ESBL și MBL. Unele tulpini de *Enterobacter* sp. au ex-

terobacter sp. strains expressed inducible cephalosporinases and extended spectrum AmpC cephalosporinases. The molecular study revealed, in decreasing frequency order, the presence of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{PSE} genes. More than half of the *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems exhibited the bla_{VIM} gene.

Conclusion: The beta-lactam resistance profiles of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* strains, mediated by beta-lactamases production, become more complex, especially in hospital units with high antibiotic selective pressure, such are the ICUs. The high percent of ESBL and MBL producing strains suggests the necessity of genotyping resistance in key Gram-negative pathogens isolated from our geographical area, that will substantially contribute to the understanding of the genetics of antibiotic resistance and of the spread of resistance determinants in the hospital environment.

Keywords: Gram negative bacilli, extended spectrum β -lactamase (ESBL), metallo- β -lactamases (MBL).

primat cefalosporinaze inductibile și cefalosporinaze de spectru extins de tip AmpC. Studiile de biologie moleculară au arătat prezența, în ordine descrescătoare, a genelor de tip bla_{SHV}, bla_{TEM} și bla_{PSE} la *Pseudomonadaceae* și a genelor de tip bla_{SHV}, bla_{TEM} și bla_{CTX-M} la *Enterobacteriaceae*. Mai mult de jumătate dintre tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* rezistente la carbapeneme au prezentat gena bla_{VIM}.

Concluzii: profilurile de rezistență la antibioticele β -lactamice datorate producerii de β -lactamaze la BGN devin din ce în ce mai complexe, în special în unitățile spitalicești în care presiunea selectivă exercitată de antibiotice este ridicată. Procentul ridicat de tulpini care exprimă fenotipurile ESBL și MBL demonstrează necesitatea genotipării principalilor BGN izolați din probe clinice, fapt care va contribui la înțelegerea substratului genetic al antibioretistenței și răspândirii genelor care codifică rezistența BGN la antibiotice în mediul spitalicesc.

Cuvinte cheie: bacili Gram negativi, β -lactamaze de spectru extins (BLSE), metallo- β -lactamaze (MBL).

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. (2008) Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamases production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide, *Clin Microbiol Infection*, 14: 90-103.
- Tenover FC. (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria, *Am J Med*, 119: S3-S10.
- Queenan AM, Bush K. (2007) Carbapenemases: The versatile β -lactamases, *Clin Microbiol Rev*, 20(3): 440-458.
- Livermore DM. (1995) β -lactamases in Laboratory and Clinical Resistance, *Clin Microbiol Rev*, 8(4): 557-584.

13. PHENOTYPIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF BETA-LACTAM SUSCEPTIBILITY PROFILES AND RESISTANCE MECHANISMS IN OPPORTUNISTIC, NON-FERMENTING GRAM NEGATIVE RODS / STUDIUL FENOTIPIC ȘI MOLECULAR AL SPECTRULUI DE SENSIBILITATE LA ANTIBIOTICELE BETALACTAMICE LA TULPINI DE BACILI GRAM NEGATIVI NON-FERMENTATIVI OPORTUNIȘTI

Irina Gheorghe, Mariana Carmen Chifiriuc,
Luminița Gabriela Măruțescu, Otilia Banu, Veronica Lazăr

Faculty of Biology, University of Bucharest / Facultatea de Biologie, Universitatea București

The purpose of this study was to investigate the beta-lactam antibiotics susceptibility profiles and the corresponding resistance genes in opportunistic, non-fermenting, Gram negative rods (NFGNR) isolated from different clinical sources.

Material and methods: The bacterial strains were isolated from patients hospitalized in the C.C. Iliescu Institute of Cardiovascular Diseases, Bucharest, from different clinical sources and identified by VITEK[®] 2 Compact. Determination of β -lactam antibiotic susceptibility spectrum was performed by disk diffusion method and E-test (MBL, ESBL and AmpC). The genetic support of the beta-lactam resistance mediated by enzymatic mechanisms was investigated by PCR.

Results: Out of the 180 *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from different clinical specimens, 28.88% of *P. aeruginosa* strains were multidrug-resistant (MDR) and 16.66% showed MBL phenotype; 14.44% of *A. baumannii* strains were pan-resistant strains (PDR), some of them producing MBL, AmpC and ESBL. Genetic studies have confirmed the phenotypic β -lactam resistance mechanisms of the analyzed strains.

Conclusion: NFGNRs revealed high levels of β -lactam antibiotics resistance mediated by broad-spectrum β -lactamases of AmpC type β -lactamases, but also by non-enzymatic

Scopul acestui studiu a fost determinarea spectrului de sensibilitate și a genelor de rezistență pentru antibioticele β -lactamice la tulpini de bacili Gram negativi non-fermentativi (BGNNF) oportuniști, izolați din diferite surse clinice.

Materiale și metode. Tulpinile bacteriene au fost izolate de la pacienți ai Institutului de Boli Cardiovasculare „C.C. Iliescu” București, din diferite produse patologice și identificate prin metoda automată VITEK[®]2 compact. Determinarea spectrului de sensibilitate la antibioticele β -lactamice s-a realizat prin metoda disc difuzivă și E-test (MBL, ESBL și AmpC). Suportul genetic al rezistenței mediate enzimatic la antibioticele β -lactamice a fost investigat prin PCR.

Rezultate. Din cele 180 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii* izolate din diferite produse patologice, 28,88% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* au fost multi-rezistente (MDR) și 16,66% au prezentat fenotip MBL; 14,44% dintre tulpinile de *A. baumannii* au fost panrezistente (PDR), unele dintre acestea fiind producătoare de MBL, AmpC și ESBL. Studiile la nivel genetic au permis evidențierea genelor codificatoare pentru enzime inactivatoare ale antibioticelor β -lactamice, în concordanță cu fenotipul identificat.

Concluzii. Tulpinile de BGNNF prezintă niveluri înalte de rezistență la antibioticele β -lactamice, mediate enzimatic de β -lactamaze cu

mechanisms and their accumulation leads to extensive resistance and pan-resistance phenotypes.

Keywords: beta-lactam antibiotics, extensive resistance, multidrug-resistant and pan-resistant strains.

spectru larg, de tip AmpC și de metalo-betalactamaze, dar și prin mecanisme ne-enzimatice, care prin acumulare, conduc la apariția fenotipurilor de rezistență extinsă și pan-rezistență.

Cuvinte cheie: antibiotice β -lactamice, rezistență extinsă, multirezistență, panrezistență.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Attal RO, Basak S, Mallick SK, Bose S. (2010) Metallobetalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*: An emerging threat to clinicians. *J Clin Diagn Res*, 4: 2691-6.
- Buiuc D, Neagu M. (2008) *Tratat de microbiologie clinică*. Editia a II-a. Editura medicală. pp.1250.
- Chifiriuc MC, Mihăescu G, Lazăr V. (2011) *Microbiologie și virologie medicală*, Editura Universității din București. pp. 747.
- Zarnea G. (1994) *Tratat de microbiologie generală*. Editura Academiei Române, pp. 1078.
- Livermore DM, Elkhizzi NA. (2012) Extended-spectrum and metallo-beta-lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. *J Chemother*, 24(2): 97-100.
- Kaul S, Brahmadathan KN, Jagannati M, Sudarshanam TD, Pitchamuthu K, Abraham OC *et al.* (2007) One year trend in Gram Negative bacterial antibiotic susceptibility patterns in a medical intensive care unit in South India. *Ind J Med Microbiol*, 25: 230-5.
- Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC. (2009) Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res*. 129: 707-12.
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. (2007) Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 3471-84.

14. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS ISOLATED FROM GASTRIC BIOPSIES / TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A UNOR TULPINI DE *HELICOBACTER PYLORI* IZOLATE DIN BIOPSII GASTRICE

Luminita Gabriela Măruțescu¹, Marcela Popa¹, Mădălina Ilie², Alina Baltac³,
Daria Bălăceanu¹, Mariana Carmen Chifiriuc¹, Veronica Lazăr¹

¹University of Bucharest Faculty of Biology, Microbiology Immunology Department; ²Emergency Hospital, Gastroenterology, Bucharest; ³Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Faculty of Medicine /

¹Facultatea de Biologie, Universitatea din București; ²Spitalul de Urgență, Gastroenterologie, București;

³Universitatea de Medicina și Farmacie Carol Davila, București, Facultatea de Medicină

Helicobacter pylori colonizes the stomach of more than 50% of the world's population, making it one of the most successful of all human pathogens. *H. pylori* is the primary cause of peptic ulcer disease and an etiological agent in the development of gastric cancer. Triple therapy, including two antibiotics, amoxicillin and clarithromycin, and a proton pump inhibitor given for one week has been recommended as the treatment of choice at several consensus conferences. However, antibiotic resistance frequently causes treatment and eradication failure of *H. pylori*. In this study, drug susceptibility of *H. pylori* strains isolated from biopsy specimens to different antibiotics currently used in the *H. pylori* infection treatment schemes was investigated.

Material and methods. Upper gastrointestinal GI endoscopy was performed, followed by the rapid urease test on gastric biopsies. The positive samples were cultivated on specific media under microaerophilic conditions and the antibiotic susceptibility patterns were determined by disk diffusion method. In case of resistant strains, the resistance genes for clarithromycin and metronidazole were assayed by PCR-RFLP.

Results and discussion. The resistance rates for the antibiotics used in the classic triple therapy proved to be high. The results indicated that the major drug resistance rate in *H. pylori* s to patients.

Helicobacter pylori colonizează stomacul a peste 50% de indivizi din populația lumii, fiind astfel unul dintre cei mai de succes patogeni umani. *H. pylori* este agentul etiologic primar al ulcerului peptic, având un rol important în dezvoltarea cancerului gastric. Terapia, ce include două antibiotice, amoxicilina și claritromicina și un inhibitor de pompă de protoni, aplicată timp de o săptămână, a fost recomandată ca tratament de elecție în cadrul a numeroase consensuri internaționale. Totuși, rezistența la antibiotice a tulpinilor de *H. pylori* determină în mod frecvent eșecul tratamentului și al eradicării bolii. În acest studiu, a fost investigată sensibilitatea la diferite antibiotice utilizate, în mod curent, în schemele de tratament, a unor tulpini de *H. pylori*, izolate din biopsii gastrice.

Materiale și metode. A fost realizată endoscopia GI urmată de un test rapid pentru urează pentru biopsiile gastrice prelevate. Probele pozitive au fost cultivate pe medii de cultură specifice, în condiții de microaerofilie, urmată de determinarea profilurilor de sensibilitate la antibiotice prin metoda disc difuzimetrică. În cazul tulpinilor rezistente, genele de rezistență pentru claritromicin și metronidazol au fost investigate prin tehnica PCR-RFLP.

Rezultate și discuții. Rezultatele testării sensibilității la antibiotic au relevat un procent ridicat al tulpinilor de *H. pylori* izolate din biopsii gastrice rezistente la antibioticele utilizate în terapia triplă clasică, în special la metronidazol,

Conclusion. Information concerning the prevalence of antimicrobial-resistant *H. pylori* strains is important in predicting therapeutic response.

Keywords: *Helicobacter pylori*, antibiotic resistance, GI endoscopy.

ceea ce indică necesitatea realizării antibiogra-mei înainte de inițierea unei terapii.

Concluzie. Informațiile privind prevalența tulpinilor de *H. pylori* rezistente la diferite substanțe antimicrobiene sunt foarte importante pentru prognosticul răspunsului la terapie.

Cuvinte cheie: *Helicobacter pylori*, rezistență la antibiotice, endoscopie GI.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Fuccio L, Laterza L, Zagari RM, Cennamo V, Grilli D, Bazzoli F. (2008) Treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Clinical Review*, 5: 321-331.
- Gisbert JP, Pajares JM. (2001) *Helicobacter pylori* therapy: first-line options and rescue regimen. *Dig Dis*, 19: 134-143.
- Megraud F, Lehours P. (2007) *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev*, 20(2): 280-322.

Session 5 – Anti-Infectious Defense Sesiunea 5 - Apărare antiinfecțioasă

15. INTERACTION OF α -SYNUCLEIN WITH CELLULAR MEMBRANES / INTERACȚIUNEA PROTEINEI α -SYNUCLEIN CU MEMBRANELE CELULARE

Imola Gabriela Zigoneanu

The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA.
Universitatea din Carolina de Nord, Chapel Hill, NC 27599, Statele Unite ale Americii

The association of α -synuclein with membranes appears to be an important factor in Parkinson's disease. My research is focused on understanding the interactions of α -synuclein with artificial membranes, extracellular plasma membrane, and intracellular membranes. Fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy were used to monitor these interactions. Large unilamellar vesicles with a composition similar to mitochondrial membranes were studied. Cardiolipin, present mainly in the inner mitochondrial membrane, is key for protein binding, and reducing the amount of cardiolipin decreases binding. The nature of cardiolipin's acyl chains is also important; cardiolipin with chains containing one double bond interact more strongly than those with chains having two double bonds or saturated acyl chains. This finding is physiologically relevant for Parkinson's disease because cardiolipin containing fatty acids with one double bond are the most abundant phospholipid in the brain. The affinity of α -synuclein for plasma membrane was tested, and only N-terminal region of the protein binds. Also, ^{19}F NMR proved useful for monitoring the interactions of proteins and fused peptide-proteins with the plasma membrane. Information on protein interactions with intracellular membranes reveals that the N-terminal region may be cleaved in cells, but further studies are needed to confirm this idea.

Keywords: α -synuclein, cardiolipin.

Asociația proteinei α -synuclein cu membranele celulare pare a fi un factor important în boala Parkinson. Cercetarea mea se axează pe înțelegerea interacțiunii proteinei α -synuclein cu membranele artificiale, membrana extracelulară și cu membranele intracelulare. Spectroscopia de fluorescență și rezonanța magnetică nucleară au fost folosite pentru a monitoriza aceste interacțiuni. Vezicule mari, unilamelare, cu o compoziție similară cu cea a membranelor mitocondriale, au fost studiate. Cardiolipina, prezentă în principal în membrana mitocondrială internă, facilitează legătura cu proteina. Natura radicalilor acil din structura cardiolipinei este, de asemenea, importantă; cardiolipina care conține o legătură dublă interacționează mai puternic decât cea cu două legături duble sau decât cea cu grupările acil saturate. Această constatare este relevantă din punct de vedere fiziologic pentru boala Parkinson deoarece cardiolipinele care conțin acizi grași cu o legătură dublă sunt fosfolipidele cele mai abundente în creier. Afinitatea α -synucleinei pentru membrana extracelulară a fost testată de asemenea, și numai regiunea N-terminală a proteinei se atașează. De asemenea, ^{19}F RMN s-a dovedit o tehnică utilă pentru monitorizarea interacțiunii dintre proteină și membrana extracelulară. Informații privind interacțiunea proteinei cu membrana intracelulară scot în evidență faptul că regiunea N-terminală poate fi secționată enzimatic în celule, dar sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma această supoziție.

Cuvinte cheie: α -synuclein, cardiolipină.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Ellis CE *et al.* (2005) Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking α -synuclein, *Mol Cell Biol*, 25: 10190-10201.
- Guan ZZ *et al.* (1994) Content and Fatty Acid Composition of Cardiolipin in the Brain of Patients with Alzheimer's Disease *Neurochem Int*, 25: 295-300.
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. (2008) Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*, 65: 1272-1284.
- Zigoneanu IG Yang YJ, Krois AS, Haque E, Pielak GJ *et al.* (2012) Interaction of α -synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1818: 512-519.
- Zigoneanu IG, Pielak GJ. (2012) Interaction of α -synuclein and a cell penetrating fusion peptide with higher eukaryotic cell membranes assessed by ^{19}F NMR. *Molecular Pharmaceutics* 9: 1024-1029.

16. GENERATION OF EBV-SPECIFIC CTLs FOR ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY FOR REFRACTORY PTLD ENCOUNTERED IN PEDIATRIC SOT_x PATIENTS / GENERAREA CELULELOR T CITOTOXICE EBV SPECIFICE PENTRU IMUNOTERAPIA CELULARĂ A LIMFOAMELOR REFRACTARE POSTTRANSPLANT LA PACIENȚII PEDIATRICI CU TRANSPLANT DE ORGANE SOLIDE

Iulia Popescu

Division of Pulmonary Allergy and Critical Care, Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA / Secția de Alergii pulmonare și Terapie intensivă, Departamentul de Medicină, Universitatea Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

Adoptive immunotherapy using EBV-specific CTLs represents an effective strategy to restore T cell immunity in solid organ transplant recipients with Posttransplant Lymphoproliferative disorders (PTLD). However, generation of EBV-specific CTLs from EBV pediatric transplant (Tx) patients (who are at highest risk of PTLT) has proven challenging. Our goal is to improve protocols for adoptive immunotherapy of refractory PTLT in children who are EBV naïve at time of transplantation and who develop primary EBV infection under therapeutic immunosuppression. Here, we investigated for the first time the ability of mature Type-1 polarized dendritic cells (DC1) generated from asymptomatic pediatric heart (H)Tx patients to prime naïve precursors or to reactivate memory cells into Type-1 EBV-specific CD8⁺ T cells *in vitro*. Our results show that while both types of *in vitro*-expanded EBV-specific CD8⁺ T cells co-express T-bet/FOXP3 transcription factors, DC1-developed from EBV positive patients reactivate Type-1/Tr1 (IFN- γ ⁺/cytotoxic⁺/IL-10⁺) CD8⁺ T cells, whereas DC1 from EBV negative HTx patients selectively prime Tr1 (IFN- γ ⁺/cytotoxic⁺/IL-10⁺⁺) CD8⁺ T cells. Exogenous IL-12p70 further increased FOXP3 nuclear expression, but did not trigger down-stream Type-1 polarization of the *de novo* primed Tr1 CD8⁺ T cells in EBV negative patients. Conversely, exogenous IFN γ or IL-27, or neutralization of IL-10 in the presence of exogenous IL-12p70 during CD8⁺ T cell priming decreased nuclear FOXP3 expression, allowed for IL-12R β 2 up-regulation and effective downstream Type-1 re-polarization (IFN- γ ⁺⁺/cytotoxic⁺/IL-10⁺). These results demonstrate an alternative polarization for EBV-specific CD8⁺ T

Imunoterapia celulară adoptivă cu celule CTL EBV specifice reprezintă o strategie eficientă pentru a restabili imunitatea celulelor T la pacienții cu transplant de organ solid cu tulburări limfoproliferative posttransplant (PTLD).

Cu toate acestea, în transplantul de organe solide la pacienții pediatrici transplantați EBV negativi, generarea de celule specifice CTLs s-a dovedit a fi o provocare. Acești pacienți sunt cei cu cel mai mare risc de PTLT. Scopul nostru este de a îmbunătăți protocoalele existente de imunoterapie celulară adoptivă a limfoamelor refractare (PTLD) la copiii care la momentul transplantului sunt EBV naivi și care în urma imunosupresiei terapeutice dezvoltă infecții primare.

Aici am investigat pentru prima dată capacitatea celulelor dendritice DC mature de tip 1 (DC1) generate de la pacienții asimptomatici pediatrici cu transplant de inimă. Investigăm capacitatea acestor DC1 de a polariza naivi precursori ori de a reactiva celule T cu memorie în celule T CD8⁺ EBV specifice *in vitro*. Rezultatele noastre arată că aceste celule generate *in vitro* EBV specifice CD8⁺ T, coexprimă amândoi factorii de transcriere Tbet și FoxP3. Celulele T generate cu DC1 de la pacienții EBV pozitivi sunt celule T CD8⁺ de memorie reactivate de Tipul 1 / Tr1 (IFN γ ⁺/citotoxic⁺/IL-10⁺). Celulele DC1 generate de la pacienții EBV negativi induc celule T CD8⁺ EBV specifice de tipul Tr1 (IFN γ ⁺/citotoxic⁺/IL-10⁺⁺). Adăugarea de IL-12p70 în sistem duce la creșterea factorului nuclear FOXP3, dar nu induce repolarizarea de tip 1 a celulelor Tr1 CD8⁺ T, induse de la pacienții pediatrici EBV negativi. În schimb, adăugarea în sistem a citokinelor de tip 1, IFN γ sau IL-27, precum și neutralizarea IL-10 în prezența IL-12p70 duce la scăderea factorului nuclear FOXP3 și permite exprimarea IL-12R β 2 (receptorului IL-12 lanț β 2), deci repolarizarea efectivă a celulelor în tip1 (IFN- γ ⁺⁺/citotoxic⁺/IL-10⁺).

cells by DC1 in pediatric HTx patients, with implications for understanding PTLD pathogenesis and the protocol of effective immunotherapy in this clinical setting.

Keywords: adoptive immunotherapy / cytotoxic T cells / EBV/ transplant.

Aceste rezultate demonstrează o cale alternativă de polarizare a celulelor EBV specific CD8⁺ induse cu celule dendritice DC1 de la pacienții pediatrici transplantați. Rezultatele au implicații în înțelegerea patogeniei PTLD și stabilirea unui protocol efectiv de imunoterapie celulară în acest context clinic.

Cuvinte cheie: imunoterapia celulară, celule T citotoxice, EBV, transplant.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. (2003) Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol*, 24(4): 207-12.
- Khanna R, Moss DJ, Gandhi M. (2005) Technology insight: applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies *Nature Clinical Practice Oncology*, 2: 138-149.
- Macedo C, Donnenberg A, Popescu I *et al.* (2005) EBV-specific memory CD8⁺ T cell phenotype and function in stable solid organ transplant patients *Transplant Immunology*, 14(2): 109-116.
- Macedo C, Orkis EA, Popescu I *et al.* (2009) Contribution of naïve and memory T cell populations to the normal human alloimmune response *American Journal of Transplantation* 9(9): 2057-66.
- Macedo C, Popescu I, Abu-Elmagd K *et al.* (2005) Augmentation of type-1 polarizing ability of monocyte-derived DCs from chronically-immunosuppressed organ transplant recipients. *Transplantation*, 79(4): 451-9.
- Macedo C, Webber SA, Donnenberg A, Popescu I *et al.* (2011) EBV-specific CD8⁺ T cells from pediatric thoracic transplant patients carrying chronic high EBV loads display contrasting features: activated phenotype and exhausted function, *J Immunology*, 186(10):5854-62.
- Macedo C, Zeevi A, Bentlejewski C, Popescu I *et al.* (2009) The impact of EBV load on T cell immunity in pediatric thoracic transplant recipients *Transplantation*, 88(1): 123-8.
- Nakayamada S, Takahashi H (2012) Lymphocyte activation and effector functions / Vaccines Helper T cell diversity and plasticity, *Curr Opin Immunology*, 24(3): 297-302.
- O'Shea JJ, Paul WE (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells *Science*. 327(5969): 1098-102.
- Pernis AB, Rothman PB (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J Clin Invest*, 109(10): 1279-1283.
- Petermann F, Korn T (2011) Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease *FEBS Lett*, 585(23): 3747-3757.
- Popescu I, Macedo C, Abu-Elmagd K *et al.* (2007) EBV-specific CD8⁺ T cell reactivation in transplant patients results in expansion of CD8⁺ Type-1 regulatory T cells", *American Journal of Transplantation*, 7(5): 1215-23.
- Popescu I, Macedo C, Zeevi A *et al.* (2003) *Ex vivo* priming of naïve T cells into EBV-specific Th1/Tc1 effector cells by mature autologous DC loaded with apoptotic/necrotic LCL *American Journal of Transplantation*, 3(11):1369-1377.
- Prendergast AJ, Klenerman P, Goulde PJR (2012) The impact of differential antiviral immunity in children and adults *Nature Reviews Immunology*, 12: 636-648.
- Ramaswami B, Popescu I, Macedo C *et al.* (2009) HLA-A01, A03 and A024 Binding Nonameric Epitopes in Polyomavirus BK virus Large T-Antigen *Human Immunology*, 70(9): 722-8.
- Ramaswami B, Popescu I, Macedo C *et al.* (2011) Polyomavirus BK Large T-antigen Derived Peptide Elicits 1 a HLA-DR Promiscuous and Polyfunctional CD4⁺ 2 T-cell Response *Clin Vaccine Immunol*, 18(5): 815-24.
- Randhawa PS, Popescu I, Macedo C *et al.* (2006) Detection of CD8⁺ T Cells Sensitized to BK Virus Large T Antigen in Healthy Volunteers and Kidney Transplant Recipients, *Human Immunology*, 67(4-5): 298-302.
- Rochford R, Cannon M, Moormannature A (2005) Opinion: Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiology*, 3: 182-187.
- Rowell E, Wilson CB (2009) Programming perpetual T helper cell plasticity *Immunity*, 30(1): 7-9.
- Tellam J, Connolly G, Green K *et al.* (2005) Endogenous processing of CD8⁺ T cells epitopes from Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 1 *J. Exp. Med.*, 199: 1421-1431.
- Tscharke DC, Woo WP, Sakala IG *et al.* (2006) Poxvirus CD8⁺ T cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice", *J Virol*, 80: 6318-6323.
- Walker S, Fazou C, Crough T *et al.* (2007) *Ex vivo* monitoring of human cytomegalovirus-specific CD81 T-cell responses using QuantiFERONS-CMV Transplant Infectious Disease, 2007, ISSN 1398-2273.
- Wiesmayr S, Webber SA, Macedo C, Popescu I *et al.* (2011) Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD *Eur J Immunol*. Nov 22 doi: 10.1002/eji.201141832.
- Yamane H, Paul WE. (2012) Memory CD4⁺ T Cells: fate determination, positive feedback and plasticity *Cell Molec Life Sci*, 69(10): 1577-1583.
- Zhu J, Paul WE. (2010) Heterogeneity and plasticity of T helper cells *Cell Res*, 20: 4-12.

17. THE ROLE OF CATECHOLAMINE STRESS HORMONES IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* - HOST COMMUNICATION / ROLUL HORMONILOR DE STRES CATECOLAMINICI ÎN COMUNICAREA DINTRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ȘI GAZDĂ

Alina Maria Holban, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr

Bucharest University, Faculty of Biology / Universitatea București, Facultatea de Biologie

Trauma and sepsis induce widespread physiological changes including an early and sustained rise in serum stress hormones - catecholamine, specifically epinephrine (adrenaline), norepinephrine (noradrenaline), and dopamine.

It is well accepted that hormones can affect host defenses against microbial infection; however, recent researches have suggested that bacterial pathogens can also utilize hormones that are produced by the host in stressful situations to enhance bacterial growth and virulence.

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is able to recognize and respond to various host stress related molecules, such as the opioid dynorphin, brain natriuretic peptide (BNP) hormones, IFN γ and also catecholamines.

Among catecholamines, Noradrenaline (Norepinephrine, NA) has proven to have the greatest effect on *P. aeruginosa* growth. Evidence regarding the impact of NA on *P. aeruginosa* virulence and gene expression is poor and controversial. Some recent studies suggested that NA reduces PAOI virulence, by repressing expression of toxin A and siderophore related genes, while others revealed that NA increase PA14 virulence, apparently through the *las* quorum-sensing pathway.

Despite the fact that some studies proposed putative target bacteria adrenergic receptors for such species as *E. coli* and *Salmonella spp.*, actual scientific proof is lacking most of key aspects required for establishing a clear molecular pathway affected by catecholamines in *P. aeruginosa*.

On the other hand, bacterial QS molecules may interfere with host signaling pathways. *P. aeruginosa* AHLs autoinducers have been demonstrated to have immunomodulatory activities by inducing IL-8 production, inhibiting lymphocyte proliferation, TNF α and IL-12 production, or stimulating host cell apoptosis. Recent evidence indicates that severe lung damage that accompanies *P. aeruginosa* infections is caused by an exuberant neutrophil response stimulated by AHL-induced IL-8. Activated phagocytes,

Traumele și stările septicemice determină modificări fiziologice ample, traduse prin creșterea timpurie și susținută a hormonilor de stres catecolaminici, precum epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) și dopamina.

Este bine acceptat faptul că hormonii pot afecta sistemele de apărare anti-infecțioasă ale gazdei; cu toate acestea, studii recente sugerează că bacteriile patogene pot utiliza hormoni produși de gazdă în condiții de stres pentru a-și intensifica virulența și rata de creștere.

Patogenul oportunist *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) poate recunoaște și răspunde la numeroase molecule de stres, precum opioidul dinorfina, peptide natriuretice cerebrale, IFN γ și catecolamine.

Dintre catecolamine, Noradrenalina (NA) s-a dovedit a avea cel mai pronunțat efect asupra creșterii *P. aeruginosa*. Cercetările legate de impactul NA asupra virulenței *P. aeruginosa* sunt în perioada de debut, iar rezultatele obținute până în prezent sunt insuficiente și contradictorii. Anumite cercetări recente sugerează că NA poate reduce virulența tulpinii de laborator *P. aeruginosa* PAOI, prin represarea expresiei genelor pentru toxine și siderofori, pe când alte studii demonstrează că NA stimulează virulența tulpinii PA14, aparent prin intermediul căii de semnalizare quorum-sensing (QS) *las*.

În pofida faptului că anumite studii au atins un stadiu ce permite propunerea de receptori bacterieni adrenergici specifici pentru specii precum *E. coli* și *Salmonella spp.*, aspecte cheie necesare pentru stabilirea unor căi moleculare afectate de catecolamine la *P. aeruginosa* lipsesc din tabloul științific actual.

Pe de altă parte, moleculele bacteriene QS pot să interfere cu căile de semnalizare ale gazdei. S-a demonstrat că acil homoserin lactonele (AHLs) aparținând speciei *P. aeruginosa* au activitate imunomodulatoare, inducând producerea de IL-8, determinând inhibiția proliferării limfocitelor, a TNF α și IL-12, sau stimulând apoptoza celulelor gazdă.

Studii recente au arătat că leziunile pulmonare severe care însoțesc infecțiile cu *P. aeruginosa* sunt

including neutrophils, may produce high levels of catecholamines, studies revealing catecholamines mediate pulmonary neutrophil sequestration.

The fact that host stress hormones may interfere with *P. aeruginosa* virulence has the potential to complicate the clinical outcome, imposing the necessity of research aiming to elucidate molecular pathways responsible for cross-kingdom communication.

Keywords: cross-communication, stress hormones, bacteria-host interaction.

Acknowledgements

This work was possible with the financial support of the Sectoral Operational Programme for Human Resources Development 2007-2013, co-financed by the European Social Fund, under the project number POSDRU/107/1.5/S/80765”, Human Resources 125/2010 and Ideas 154/2011.

cauzate în principal de un răspuns neutrofilic excesiv, indus de IL8, a cărui expresie este stimulată de AHL. Fagocitele activate, inclusiv neutrofilele, au capacitatea de a produce niveluri crescute de catecholamine, cercetările demonstrând că acest exces hormonal poate fi responsabil de sechestrarea intrapulmonară a neutrofilelor.

Faptul că hormonii de stres ai gazdei pot să interfere cu virulența *P. aeruginosa* reprezintă un aspect deosebit de important, cu un potențial remarcabil de a modifica tabloul clinic infecțios, impunând totodată necesitatea unor studii menite să elucideze căile moleculare responsabile pentru această comunicare încrucișată.

Cuvinte cheie: comunicare încrucișată, hormoni de stres, interacțiuni bacterii-gază.

Aceste studii au beneficiat de suportul material al Programului Sectorial Operațional pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, co-finanțat de Fondul social European, POSDRU/107/1.5/S/80765, Resurse Umane 125/2010 și Idei 154/2011.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Belay T, Sonnenfeld G (2002) Differential effects of catecholamines on *in vitro* growth of pathogenic bacteria, *Life Sciences*, 71(4): 447–456.
- Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The *QseC* sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor, *Proc Natl Acad Sci*, 103(27): 10420–10425.
- Freestone PPE, Haigh RD, Williams PH, Lyte M (1999) Stimulation of bacterial growth by heat-stable norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett*, 172: 53–60.
- Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH (1995) Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock*, 4: 269–273.
- Hegde M, Wood TK, Jayaraman A (2009) The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the *las* quorum-sensing pathway, *Appl Microbiol Biotechnol*, 84: 763–776.
- Karavolos MH, Bulmer DM, Spencer H *et al.* (2011) *Salmonella Typhi* sense host neuroendocrine stress hormones and release the toxin haemolysin E, *EMBO reports*, 12(3): 252–258.
- Li W, Lyte M, Freestone PP, Ajmal A, Colmer-Hamood JA, Hamood AN (2009) Norepinephrine represses the expression of *toxA* and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol Lett*, 299: 100–109.
- Lipton JM, Catania A (1997) Anti-Inflammatory Influence of the Neuroimmunomodulator α -MSH, *Immunol Today*, 18: 140–145.
- Lyte M, Ernst S (1992) Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci*, 50: 203–13.
- Morken JJ, Warren KW, Xie Y, Rodriguez JL, Lyte M (2002) Epinephrine as a mediator of pulmonary neutrophil sequestration, *Shock*, 18(1): 46–50.
- Smith RS, Fedyk ER, Springer TA *et al.* (2001) IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol*. 167: 366–374.
- Tateda K, Ishii Y, Horikawa M *et al.* (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun*, 71(10): 5785–5793.
- Telford G, Wheeler D, Williams P *et al.* (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Has Immunomodulatory Activity *Infect Immun*, 66, 36–42.
- Ward PA, Flierl MA, Rittirsch D, Sarma JV, Zetoune FS (2008) Adrenergic regulation of the lung inflammatory response. ERS Congress, Berlin, 2008.
- Wu L, Estrada O, Zaborina O *et al.* (2005) Recognition of Host Immune Activation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Science*, 309: 774–777.
- Zaborina O, Lepine F, Xiao G *et al.* (2007) Dynorphin Activates Quorum Sensing Quinolone Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS Pathog*, 3: 35.

18. SOLUBLE MOLECULES SECRETED BY BACTERIAL CELLS COULD MODULATE HELA CELLS FUNCTIONS TO PREVENT THE DEVELOPMENT OF VIRAL INFECTION / MODULAREA INFECȚIEI VIRALE ÎN CELULELE HELA DE CĂTRE FACTORI SOLUBILI BACTERIENI

**Coralia Bleotu¹, Mariana Carmen Chifiriuc², Grațiela Pîrcălăbioru³, Roxana Drăgușel¹,
Ioana Mădălina Aldea¹, Carmen Cristina Diaconu¹, Veronica Lazăr², Costin Eugen Cernescu¹**

¹“Ștefan S. Nicolau” Institute of Virology, Romanian Academy, Bucharest; ²University of Bucharest,
Faculty of Biology; ³Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland /
¹Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”, Academia Română, București; ²Universitatea din București,
Facultatea de Biologie; ³Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

Both viral and bacterial pathogens have specific machineries to modulate the host cells upon infection. Microbial pathogens are engaged in a double or even multi-sided conversation with their host. The purpose of this study was to investigate how a viral infection affecting the epithelial cells could be influenced by the presence of the opportunistic *Staphylococcus aureus* soluble mediators. The viral antigens presence, apoptosis and cytokine profiles of HeLa cells infected with HSV-1 and pre-/posttreated with different bacterial soluble fractions were evaluated. Soluble bacterial molecules could modulate HeLa cells functions to prevent the development of viral infection, but later stages of viral infection are less affected by bacterial soluble mediators. The *in vitro* cooperative action of HSV-1 and of *S. aureus* soluble fractions modulated the immune response of the infected HeLa cells, mainly by triggering the release of pro-inflammatory cytokines. These results revealed that the host status (already infected or not) and the moment of the secondary infection are key points in the evolution of the infectious process. However, further studies will be necessary to identify the microbial and host key factors or components responsible for the intracellular signalling events and the subsequent cellular responses involved in this cooperative mechanism.

Keywords: Quorum sensing, *Staphylococcus aureus*, Herpes Simplex Virus infection, cytokine, apoptosis.

Agenții patogeni virali și bacterieni posedă mecanisme specifice de modulare a celulelor gazdă infectate. Scopul acestui studiu a fost investigarea modului în care infecția cu HSV a celulelor epiteliale HeLa ar putea fi influențată de prezența mediatorilor solubili produși de bacteria oportunistă *Staphylococcus aureus*. Au fost evaluate: prezența antigenelor virale, apoptoza și profilul citokinic produs de celule HeLa infectate cu HSV-1 și pre-/post tratament cu diferite fracții bacteriene solubile. Molecule bacteriene solubile ar putea modula funcțiile celulelor HeLa în scopul prevenirii dezvoltării infecției virale, dar stadiile tardive ale infecției virale sunt mai puțin afectate de mediatorii solubili bacterieni. *In vitro*, acțiunea cooperativă a HSV-1 și a fracțiilor solubile ale *S. aureus* modulează răspunsul imun în celulele HeLa infectate, în principal, prin inducerea producerii de citokine pro-inflamatorii. Aceste rezultate demonstrează faptul că statusul gazdei (deja infectată sau nu) și momentul unei infecții secundare sunt puncte cheie în evoluția procesului infecțios. Cu toate acestea, sunt necesare alte studii pentru a identifica atât factorii microbieni cheie, cât și cei ai gazdei implicați în acest mecanism de cooperare.

Cuvinte cheie: Quorum sensing, *Staphylococcus aureus*, infecția cu virus Herpes Simplex, citokine, apoptoza.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Atkinson, S.; Williams, P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface*, **2009**, doi: 10.1098/rsif.2009.0203.
- Hukkanen, V.; Broberg, E.; Salmi, A.; Erälä, J.P. Cytokines in experimental Herpes Simplex Virus infection. *Int Rev Immunol* **2002**, *21*, 355-371.
- Sifri, C.D. Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense, *Clin. Inf. Dis.*, **2008**, *47*, 1070–1076.
- Chifiriuc, C.M.; Lixandru, M.; Iordache, C.; Bleotu, C.; Larion, C.; Dracea, O.; Lazar, V.; Antohe, F.; Israil, A. Internalization of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial cells by non-phagocytic, epithelial human cells. *Rom Biotech Letters* **2008**, *13*, 3651-3658.

19. APPLICATION OF REVERSE VACCINOLOGY IN DESIGNING A VACCINE FOR STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTIOUS ENDOCARDITIS / APLICAREA TEHNICILOR DE REVERS VACCINOLOGIE ÎN DEZVOLTAREA UNUI VACCIN PENTRU ENDOCARDITA INFECȚIOASĂ CAUZATĂ DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mihaela Oprea

Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology, Bucharest /
Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie Cantacuzino, București

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen causing skin and tissue infections, but also other life threatening infections as pneumonia and endocarditis. Experimental models for endocarditis demonstrated that virulence factors of *S. aureus*, that are very important in infection of heart vegetations, are surface proteins which promote bacterial adherence. Until now, efforts to develop effective vaccines against *S. aureus* have been unsuccessful, in part due to variety of virulence factors produced by this microorganism.

Reverse vaccinology is applied to develop potential vaccine candidates. Process of candidate discovery start with *in silico* testing, using the protein information of whole antigen. The basic epitopes prediction strategy rely on detection of a common antigenic 9-mer epitope meant to be able to stimulate both the B-cell and T-cell mediated immunity. Surface proteins are chosen, such as fibronectin binding protein A and B (FnbPA, FnbPB). FnbPA is present in the majority of *S. aureus* isolates, and FnbPB seems to be prevalent in systemic infection isolates, including endocarditis.

Using a web-based system, two T-epitopes for FnbPA (FDFTLSNNV and YVDGYIETO) and two T- epitopes for FnbPB (IVVGMGQEK and FEYHTAVEG) were detected as antigenic, potential vaccine candidates. Epitopes sequences FDFTLSNNV and IVVGMGQEK are conserved among the seven *S. aureus* genomes screened from NCBI GenBank. FnbA epitope sequence FDFTLSNNV is conserved also in FnbPB, in proportion of more than 80% percent,

Staphylococcus aureus este un patogen oportunist implicat în infecții ale pielii și țesuturilor, dar și în alte infecții severe ca pneumonia și endocardita. Modele animale experimentale pentru studierea endocarditei au demonstrat că proteinele de suprafață sunt factori de virulență foarte importanți pentru aderența bacteriei la vegetațiile cardiace. Până acum, eforturile pentru dezvoltarea unui vaccin eficient împotriva infecției cu *S. aureus* au fost sortite eșecului, și din cauza mării varietăți de factori de virulență ai acestui microorganism.

Se prezintă tehnici de revers-vaccinologie aplicate pentru identificarea unui posibil candidat pentru vaccin. Detectarea candidatului optim debutează cu testarea *in silico*, utilizând informația existentă privind structura proteică a unui antigen dat. Strategia de bază a predicției de epitopi implică identificarea unui epitop de 9 aminoacizi care să stimuleze atât imunitatea mediată de limfocitele T, cât și imunitatea mediată de limfocitele B. Au fost alese proteine de suprafață, cum ar fi proteinele de legare la fibronectina A și B (FnbPA și FnbPB). FnbPA este produsă de majoritatea izolatelor de *S. aureus*, iar FnbPB este produsă cu precădere de izolate din infecții sistemice, inclusiv endocardită.

Utilizând un sistem bazat pe software-uri disponibile pe internet, au fost identificați doi epitopi T pentru FnbPA (FDFTLSNNV și YVDGYIETO) și doi epitopi T pentru FnbPB (IVVGMGQEK și FEYHTAVEG) potențial antigenici. Secvențele corespunzătoare epitopilor FDFTLSNNV și IVVGMGQEK sunt conservate în șapte genomuri de *S. aureus* aflate în

suggesting it to be a good choice for vaccine development. *In vitro* immunologic assay is necessary to confirm the T - epitopes suitability.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, reverse-vaccinology, T-epitope, fibronectin binding protein.

NCBI GenBank. Secvența epitopului FDFTLSNNV din FnbA este conservată și în structura FnbPB în proporție de peste 80%, ceea ce îl face un bun candidat pentru dezvoltarea unui vaccin. Pentru validarea epitopilor T sunt necesare teste imunologice *in vitro*.

Cuvinte cheie: *Staphylococcus aureus*, reverse-vaccinologie, epitop T, proteina de legare la fibronectină.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Ferry T *et al.* (2005) Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep*, 7: 420-428.
- Heying R, van de Gevel J, Que YA, Moreillon P, Beekhuizen H (2007) Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 97(4): 617-626.
- Menakha M, Manoharan C (2001) Application of reverse vaccinology in designing a common vaccine for bacterial endocarditis, *Intern J Pharm Sci Rev Res*, 11(1): 95 – 101.
- Moreillon P *et al.* (1995) Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun*, 63(12): 4738 - 4743.
- Nienaber JJ *et al.* (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxin and adhesins. *J Infect Dis*, 204(5): 704-713.
- Que YA *et al.* (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med*, 201(10): 1627–1635.
- Sette A, Rappuoli R (2010) Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics, *Immunity*, 33: 530 – 541.

Session 6 - New Products with Antimicrobial Activity Sesiunea 6 - Noi produse cu activitate antimicrobiană

20. NANOTECHNOLOGY APPLICATIONS IN ESSENTIAL OILS PHARMACEUTICAL FORMULATIONS FOR THE MANAGEMENT OF BIOFILMS RELATED INFECTIONS / APLICAȚII NANOTEHNOLOGICE ÎN FORMULAREA FARMACEUTICĂ A UNOR ULEIURI VOLATILE - SOLUȚII PENTRU MANAGEMENTUL INFECȚIILOR CU MICROORGANISME INCLUSE ÎN BIOFILME

Crina-Maria Kamerzan (Saviuc)^{1,2}, Alexandru Mihai Grumezescu³, Anton Ficăi³,
Ecaterina Andronescu³, Mariana Carmen Chifiriuc¹, Veronica Lazăr¹

¹University of Bucharest, Faculty of Biology; ²S.C. Biotehnos S.A.; ³Polytechnical Institute,
Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Polytechnical University, Bucharest /

¹Facultatea de Biologie, Universitatea București; ² S.C. Biotehnos S.A.;

³Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor, Universitatea Politehnică București

Introduction. Understanding the parameters that govern the microbial adhesion phenomenon to the inert substrates represented by the prosthetic devices is a particularly important research direction. The adherence capacity is considered a virulence factor in pathogenic microorganisms, but, in a broader sense, it is classified among the factors that characterize the interaction host-pathogen/commensal. The purpose of this study was the synthesis and characterization of the magnetite nanoparticles functionalized with bioactive phytocompounds (volatile oils and usnic acid) for obtaining modified surfaces for biomaterials with antibiofilm properties.

Material and methods. Microbial strains were isolated from various clinical specimens. Magnetite nanoparticles were synthesized by Massart method under microwave. Nanosystems – magnetite nanoparticles/bioactive compounds, obtained by adsorption on the surface film/powder nanoparticles of the bioactive compounds were characterized by X-ray diffraction, electron microscopy and IR spectroscopy. Dynamics of the experimental biofilm development on the modified inert surfaces was quantified by determining the number of viable cells (VBCs) and the formed biofilms architecture was studied by confocal microscopy.

Introducere. Înțelegerea parametrilor care guvernează fenomenul de aderență microbiană la substraturi inerte reprezentate de dispozitive protetice este o direcție de cercetare deosebit de importantă. Capacitatea de aderență este considerată un factor de virulență la microorganismele patogene, într-un sens mai larg, fiind clasificată între factorii care caracterizează interacțiunea gazdă-microorganism patogen/comensal. Scopul acestui studiu a fost sinteza și caracterizarea unor sisteme nano-fitochimice pe bază de uleiuri volatile și acid usnic destinate obținerii unor biomateriale cu suprafețe modificate cu proprietăți antibiofilm.

Materiale și metode. Tulpinile microbiene au fost izolate din specimene clinice diverse. Nanoparticulele de magnetită au fost sintetizate prin metoda Massart, în condiții de microunde. Nanosistemele Fe₃O₄/ compuși bioactivi, obținute prin adsorbție la suprafața filmului/ pulberii de nanoparticule a compușilor bioactivi, au fost caracterizate prin difracție de raze X, microscopie electronică și spectrometrie IR. Dinamica dezvoltării biofilmelor experimentale pe suprafețele inerte modificate s-a cuantificat prin determinarea numărului de celule viabile, iar arhitectura biofilmelor formate s-a studiat prin microscopie confocală.

Results. Characterization techniques revealed the morphology and the functionalization of the magnetite nanoparticles with bioactive compounds. Phyto-nanosystems adsorbed on inert surfaces reduces the adherence capacity of the studied microorganisms, qualitatively confirmed by confocal microscopy images and quantitatively assessed by drastic VBCs decrease. The results highlight the opportunity of using phyto-nanosystems for obtaining modified surfaces of the biomaterials used for medical devices manufacture, as a complementary strategy for the antibiotic therapy in the management of biofilms related infections.

Keywords: microbial adherence, phyto-nanosystems, antibiofilm properties.

Rezultate. Tehnicile de caracterizare relevă morfologia și funcționalizarea cu compuși bioactivi a nanoparticulelor de magnetită. Fito-nanosistemele adsorbite pe suprafețe inerte determină reducerea capacității de aderență a microorganismelor, confirmată calitativ prin imaginile de microscopie confocală și cantitativ prin scăderea numărului de celule viabile. Rezultatele obținute arată oportunitatea utilizării sistemelor nano-fitochimice pe bază de uleiuri volatile și acid usnic cu proprietăți antibiofilm pentru obținerea unor dispozitive medicale cu suprafețe modificate.

Cuvinte cheie: aderența microbiană, sisteme nano-fitochimice, proprietăți antibiofilm.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronesu E (2012) Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity, *Nanoscale Res Lett*, 7: 209.
- Ho Sui S, Fedynak A, Hsiao W, Langille M, Brinkman F (2009) The Association of Virulence Factors with Genomic Islands, *PLoS One*, 4(12): e8094.

21. VEGETAL EXTRACTS WITH ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY ON BACTERIAL LPS STIMULATED ENDOTHELIAL CELLS / ACTIVITATEA ANTIINFLAMATORIE A UNOR EXTRACTE VEGETALE ASUPRA CELULELOR ENDOTELIALE STIMULATE CU LPS BACTERIAN

Brîndușa Dumitriu, Laura Olariu, Crina Saviuc, Mariana Constantinovici

S.C. Biotehnos S.A., Research Department, Otopeni, Romania /
S.C. Biotehnos S.A., Departamentul de Cercetare, Otopeni, Romania

Introduction. Bacterial LPS induces activation of downstream signalling pathways causing endothelial cells to release pro-inflammatory cytokines or express abundant adhesion molecules. This inflammatory response trigger is an accurate model for the demonstration of the anti-inflammatory effect of the specific phytotherapeutic extracts on the vascular endothelium. In this respect, two vegetal extracts from *Arctium lappa* and *Centaurea cyanus* have been studied for their supposed anti-inflammatory properties on LPS stimulated endothelial cells.

Material and methods. The adhesion molecules expression, VCAM-1 and ICAM-1, was assessed by flow cytometry (fluorescence labeling with antibodies corresponding to ICAM-1 and VCAM-1, respectively) for the negative control and LPS stimulated endothelial cells belonging to the standardized HUVEC line. Also, a comparison of the results with the human inflammatory cytokine secretion (IL6 and IL8), expressed in pg/ml (marking and analysis of BD Cytometric Bead Array kit (CBA) - Human inflammatory cytokines kit (BD Pharmingen) was performed.

Results. Local infection mimicking conditions showed a differential anti-inflammatory effect of the tested vegetal extracts, by inhibiting the cytokines secretion, IL6 and IL8, in a significant dose dependent manner. This action highlights the anti-inflammatory effect, exercised both by stopping recruitment and activation of neutrophils (IL8 inhibition) and by avoiding inflammation chronicization (IL6 inhibition). As well as, ICAM, the adhesion molecule specific for small blood vessels, is inhibited by vegetal extracts.

Introducere. LPS bacteriene induc activarea unor căi de semnalizare în celule endoteliale, determinând eliberarea citokinelor pro-inflamatorii și expresia moleculelor de adeziune. Simularea *in vitro* a inflamației realizată cu LPS a constituit un model de studiu pentru a demonstra efectul antiinflamator al unor extracte vegetale din *Arctium lappa* și *Centaurea cyanus* studiate pentru proprietățile lor antiinflamatoare asupra endoteliului vascular.

Materiale și metode. S-a evaluat expresia proteică a VCAM-1 și ICAM-1 prin citometrie în flux: (marcare fluorescentă cu anticorpii corespunzatori pentru ICAM-1, respectiv VCAM-1, APC Mouse Anti-Human CD54 pentru evidențierea ICAM-1 (*intracellular-adhesion molecule*) și PE-Mouse Anti-Human CD106 pentru evidențierea VCAM-1 (*vascular-cell-adhesion molecule*). Rezultatele se analizează comparându-se media canalului de fluorescență APC, respectiv PE pentru probele achiziționate. Rezultatele au fost comparate cu secreția citokinelor inflamatorii umane (IL6 și IL8), exprimate în pg/ml (marcarea și analiza cu kitul BD Cytometric Bead Array (CBA)- Human Inflammatory Cytokines kit (BD Pharmingen).

Rezultate. Simularea condițiilor producerii unei infecții localizate a arătat un efect antiinflamator diferențial al extractelor vegetale testate, prin inhibarea secreției de citokine, IL6 și IL8, specific de doză. Prin această acțiune se evidențiază efectul antiinflamator, exercitat atât prin stoparea recrutării și activării neutrofilelor (inhibarea IL8), cât și prin evitarea cronicizării inflamației (inhibarea IL6). De asemenea, este inhibată în special expresia moleculelor de ade-

Conclusions. Vegetal extracts from *Arctium lappa* and *Centaurea cyanus* show an anti-inflammatory response on LPS stimulation of endothelial cells, through convergent actions on IL6, IL8 and ICAM expression.

Keywords: LPS, inflammation, HUVEC, vegetal extracts.

ziune de tip ICAM, caracteristică vaselor sanguine mici.

Concluzii. Extractele vegetale de *Arctium lappa* și *Centaurea cyanus* prezintă răspuns antiinflamator la acțiunea LPS asupra celulelor endoteliale, prin acțiune concertată asupra IL6, IL8 și expresiei ICAM.

Cuvinte cheie: LPS, inflamație, HUVEC, extracte vegetale.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Kang HJ, Lee SM, Lee H-H, Kim J *et al.* (2007) Mannose-binding lectin without the aid of its associated serine proteases alters lipopolysaccharide-mediated cytokine/chemokine secretion from human endothelial cells. *Immunology*, 122(3): 335–342.
- Peschen M, Lahaye T, Hennig B *et al.* (1999) Expression of the Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the Skin is Modulated in Progressing Stages of Chronic Venous Insufficiency - *Acta Derm Venereol* (Stockh); 79: 27-32.

22. THE INTERACTION OF GENTAMICIN ENCAPSULATED POLYSACCHARIDES WITH SELECTED INVASIVE BACTERIA / INTERACȚIUNEA BACTERIILOR INVAZIVE CU GENTAMICINA ÎNCAPSULATĂ ÎN MICROCAPSULE POLIZAHARIDICE

Cristina Croitoru², Alexandru Mihai Grumezescu³, Mariana Carmen Chifiriuc¹, Veronica Lazăr¹

¹University of Bucharest, Faculty of Biology; ²S.C. Biotehnos S.A.; ³Polytechnical University of Bucharest, Faculty of Applied Chemistry / ¹Universitatea București, Facultatea de Biologie; ²S.C. Biotehnos S.A;

³Universitatea Politehnică București, Facultatea de Chimie Aplicată

Introduction. Infections with intracellular pathogens, responsible for invasive enteric pathology are associated with high mortality rate. Targeted drug delivery, one of the fundamental concepts of pharmaceutical industry, could offer good alternative therapeutic strategies for intracellular antibiotic delivery, efficient for invasive bacterial eradication and resistance emergence prevention. We studied the intracellular delivery of gentamicin encapsulated in 3 types of bacterial polysaccharides towards the rates of intracellular bacteria killing.

Material and methods. 16 strains of *Enterobacteriaceae* (*Lysteria monocytogenes*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli*) have been used as model intracellular pathogens. Internalization in both Hep-2 and HeLa was studied. Three types of bacterial polysaccharides (K742, K800, P568) were used for gentamicin encapsulation, known for its poor cell membrane permeability limits. The efficiency of encapsulated gentamicin sulphate treatment was investigated in terms of adherence and bacterial invasion evaluation, by modified Cravioto method. Morphological modifications of cellular substrate invaded by enteric bacteria were observed by fluorescent microscopy.

Results. Bacterial strains invaded Hep-2 and HeLa cells with different rates. Fluorescent cellular substrate microscopy images show cytoplasmic extensions and endocytic vacuoles. The encapsulated antibiotic was internalised and delivered intracellularly, killing the invasive bacteria with specific treatment variant efficiency. This study sustains the utility of new controlled

Introducere. Infecțiile cu agenți patogeni intracelulari invazivi, responsabile pentru patologia enterică, sunt asociate cu o rată ridicată a mortalității. Sistemele farmaceutice de transport la țintă ar putea oferi strategii terapeutice alternative pentru transportul transmembranar al unor antibiotice, determinând eradicarea infecțiilor bacteriene invazive și prevenirea apariției antibioretistenței. Scopul studiului de față a fost optimizarea transportului transmembranar și al efectului microbicid față de bacterii intracelulare al gentamicinei încapsulate în 3 tipuri de polizaharide bacteriene.

Materiale și metode. 16 tulpini aparținând unor specii din genuri diferite ale familiei *Enterobacteriaceae* (*Lysteria monocytogenes*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli*) au fost utilizate ca microorganisme model pentru evidențierea internalizării în celule eucariote din linii celulare standardizate, Hep-2 și HeLa. Pentru încapsularea gentamicinei, cunoscută pentru penetrabilitatea redusă prin membrana celulară, s-au utilizat trei tipuri de polizaharide bacteriene (K742, K800, P568). Eficiența tratamentului de sulfat de gentamicină a fost studiată apreciindu-se cantitativ numărul de celule bacteriene aderente versus numărul de celule internalizate, prin metoda Cravioto modificată. Modificările morfologice ale substratului celular invadat de bacteriile enterice au fost vizualizate prin microscopie de fluorescență.

Rezultate. Tulpinile bacteriene au invadat celulele eucariote Hep-2 și HeLa cu rate diferite, evidențiindu-se microscopic apariția pseudopodelor și a vacuolelor de endocitoză. Antibioticul încapsulat a fost livrat intracelular, efectul mi-

drug delivery system in eradication of intracellular pathogens.

Keywords: antibiotic therapy, drug delivery, intracellular bacteria, encapsulated gentamicin.

crobicid fiind specific pentru modalitatea de încapsulare. Acest studiu susține eficiența noilor sisteme de livrare controlată a antibioticelor sintetizate, în tratamentul infecțiilor cu bacterii intracelulare.

Cuvinte cheie: antibioterapie, sisteme de transport la țintă, bacterii intracelulare, gentamicină încapsulată.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Cavaillon J-M, Annane D. (2006) Compartmentalization of the inflammatory responses in sepsis and SIRS, *J Endotoxin Res*, 12: 151-170.
- Jann K. (1985) Isolation and characterization of capsular polysaccharides (K antigens) in *E. coli*, Virulence of *E.coli*, Academic Press, London, 1985.
- Ranjan A, Pothayee N, Vadala TP *et al.* (2010) Efficacy of Amphiphilic Core-Shell Nanostructures Encapsulating Gentamicin in an *in vitro* *Salmonella* and *Listeria* Intracellular Infection Model *Antimicrob Agents Chemother*, 54(8): 3524–3526.

23. CHALLENGES FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTIMICROBIAL STRATEGIES / TENDINȚE ACTUALE ÎN DEZVOLTAREA DE NOI STRATEGII ANTIMICROBIENE

Mariana Carmen Chifiriuc^{1,2}, Alexandru Mihai Grumezescu³, Veronica Lazăr¹

¹University of Bucharest, Faculty of Biology; ²Cantacuzino National Institute of Research-Development for Microbiology and Immunology, Bucharest; ³Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Polytechnical University, Bucharest / ¹Universitatea din București, Facultatea de Biologie;

²Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie Cantacuzino, București;

³Universitatea Politehnică București, Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor

Despite the major contribution of antibiotics in the control of bacterial infections, significant problems still exist, due to the emergence of bacterial resistance either via genetic mechanisms or biofilm formation, rendering bacteria tolerant to antibiotics. Most of the conventional antimicrobial approaches strategies treat rather than prevent infection. The huge amounts of administered antibiotics are representing a threat, both in terms of ecological burden and toxicity. This talk will present some recent data on the research of new natural or synthetic antimicrobial compounds (mediating microbial killing or growth inhibition) as well of the promising field of the antipathogenic strategies (mediating the attenuation of bacterial virulence, without interfering with the microbial growth and having as target the regulatory bacterial systems that govern the expression of virulence factors). Instead of destroying the bacteria and favoring the selection of resistance, the antipathogenic drugs disarm them and limit the amount of harm they can cause, rendering the immune system able to clear the infection. Targeting bacterial invasion or colonization rather than bacterial survival may be a valid strategy for prophylactic intervention in specific host populations, such as those in intensive-care units and burn wards rife with drug-resistant bacteria and during outbreaks. The contribution of nanotechnology to the stabilization and release control of natural/ synthetic compounds with antimicrobial activity and quorum sensing inhibitors, as well as to the development of new biomaterials that prevent microbial biofilm formation will be highlighted.

În ciuda contribuției majore a antibioticelor în controlul infecțiilor bacteriene, acestea rămân în prezent una dintre problemele majore de sănătate publică la nivel global, datorită emergenței rezistenței la antibiotice, fie prin mecanisme genetice, fie prin dobândirea toleranței sau rezistenței fenotipice la antibiotice, în urma formării biofilmelor. Cele mai multe dintre strategiile convenționale antimicrobiene se adresează tratării, și nu prevenirii infecțiilor. Cantitățile imense de antibiotice administrate în terapia anti-infecțioasă reprezintă un factor de risc, atât din punct de vedere ecologic, cât și al multiplelor efecte secundare. Această prelegere prezintă rezultatele unor studii privind descoperirea de noi compuși naturali sau de sinteză cu activitate antimicrobiană (microbicidă/microbiostatică), precum și dezvoltarea de noi strategii antipatogenice (care mediază atenuarea virulenței bacteriene, fără a interfera cu creșterea microbiană, având ca țintă sistemele de reglare a expresiei factorilor de virulență). Spre deosebire de substanțele antimicrobiene clasice care distrug microorganismele și favorizează selecția unor mutante rezistente, cele antipatogenice dezarmează potențialul lor patogen, redând sistemului imunitar capacitatea de a elimina infecția. Direcționarea strategiilor antimicrobiene către limitarea invaziei sau colonizării bacteriene poate constitui de asemenea un mijloc de intervenție profilactică, mai ales în cazul unor populații cu risc crescut de colonizare cu bacterii multi-rezistente la antibiotice (secții de terapie intensivă, secții de arși) sau în timpul epidemiilor. Vor fi evidențiate de asemenea studii privind contribuția nanotehnologiei la stabilizarea și eliberarea controlată a compușilor naturali sau sintetici cu activitate antimicrobiană sau anti-patogenică, precum și la dezvoltarea de noi biomateriale cu proprietăți anti-biofilm.

Keywords: natural compounds, chemical substances, antipathogenic, quorum sensing inhibitors, nanotechnology.

Cuvinte cheie: compuși naturali, substanțe chimice, antipatogenic, inhibitori de quorum sensing, nanotehnologie.

REFERENCES / BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Boucher HW, Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr. (2009) Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 48:1-12.
- Bush A, Alton EFW, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A (eds) (2006) Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006, vol 34, pp 180–186.
- Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics (2006) New Classes of Antimicrobials. Challenges for the Development of New Antimicrobials - Rethinking the Approaches: Report of a Workshop. In: National Research Council (US) Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics: New Classes of Antimicrobials; National Research Council (US) Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics: Immunomodulation. *Treating Infectious Diseases in a Microbial World: Report of Two Workshops on Novel Antimicrobial Therapeutics*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19843>.
- Gilbert DN, Guidos RJ, Boucher HW *et al.* (2010) The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis*, 50: 1081–83.

AUTHOR INDEX /
INDEX AUTORI

- A -

Aldea, Ioana Mădălina 142
Allerberger, Franz 124
Andronescu, Ecaterina 145

- B -

Baltac, Alina 135
Banu, Otilia 131,133
Bălăceanu, Daria 135
Bilca, Doina 123
Bleotu, Coralia 142
Borcan, Alina-Maria 126
Borcan, Elvira 127,131

- C -

Caplan, Dana-Magdalena 126
Caplan, Marius-Eduard 126
Cernescu, Costin Eugen 142
Chifiriuc, Mariana Carmen 117,129,131,
133,135,140,142,145,149,151
Codiță, Irina 121
Constantinovici, Mariana 147
Cotar, Ani Ioana 131
Croitoru, Cristina 149
Czobor, Ilda 117,131

- D -

Damian, Maria 113
Diaconu, Carmen Cristina 142
Dinu, Sorin 115
Drăgușel, Roxana 142
Dumitriu, Brîndușa 147

- E -

Ecovoiu, Alexandru Al. 117

- F -

Ficai, Anton 145

- G -

Gheorghe, Irina 133
Ghiță, Camelia Mihaela 127
Grumezescu, Alexandru Mihai 145,149,151

- H -

Holban, Alina-Maria 126,140
Huhulescu, Steliana 124

- I -

Iancu, Luminița Smaranda 118
Ilie, Mădălina 135

- K -

Kamerzan (Saviuc), Crina-Maria 145,147

- L -

Lazăr, Veronica 127,131,133,135,
140,142,145,149,151
Lőrinczi, Lilla 123

- M -

Mateescu, Andreea Lorena 129
Măruțescu, Luminița Gabriela 129,131,
133,135
Mihăescu, Grigore 131
Mítache, Mihaela Magdalena 129
Molnár, Szabolcs 123

- O -		- S -	
Olariu, Laura	147	Sagel, Ulrich	124
Oprea, Mihaela	143	Stîngu, Cătălina Suzana	120
Opreșan, Gabriela	115	Stöger, Anna	124
		Străuș, Monica	115
- P -		Székely, Edit	123
Pietzka, Ariane	124	Szócs-Gazdi, Uzonka	123
Pîrcălăbioru, Grațiela	142		
Popa, Marcela	135	- V -	
Popescu, Iulia	138	Vas, Krisztina Eszter	123
		Vassu Dimov, Tatiana	129
- R -		- Z -	
Rațiu, Attila Cristian	117	Zigoneanu, Imola Gabriela	137
Ruppitsch, Werner	124		

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Aims and Scope

Romanian Archives of Microbiology and Immunology, an international journal dedicated to original research work, publishes papers focusing on various aspects of microbiology and immunology. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology* is indexed in MEDLINE. The frequency of the Journal is currently four issues per year.

Categories of manuscripts

Full-length articles are full-length descriptions of original research (up to 10 printed pages).

Reviews are comprehensive appraisals of research in a field of current interest. All reviews are subject to the normal review process (up to 15 printed pages).

Rapid Communications are brief, definitive reports of highly significant and timely findings in the field (up to 5 printed pages).

Submission of manuscripts

Manuscripts and all attached files (tables and illustrations) should be submitted in electronic form to the Editorial Office, e-mail address: archives@cantacuzino.ro or by regular mail (address: Redactia Revistei Romanian Archives of Microbiology and Immunology, Spl. Independentei 103, sector 5, 050096, Bucuresti, Romania) on compact disk, preferably accompanied by three copies of the manuscript, including tables and figures, printed on one side of A4 paper format, double-spaced, with 2.5 margins.

The preferred software is Microsoft Word.

In order to speed up the process of review, manuscripts should be prepared very carefully.

Cover letter

Each manuscript submitted to the Romanian Archives of Microbiology and Immunology must be accompanied by a Cover letter including an explicit statement by the corresponding author that:

- the manuscript represents an original work, has not been previously published, and has not been submitted simultaneously for publication elsewhere.
- the manuscript, as submitted, has been reviewed and approved by all named authors and that all authors concur with the submission and are responsible for its content.

Editorial review and acceptance

All manuscripts are subject to editorial review by professional peer reviewers (at least two). The acceptance criteria for all manuscripts are based on quality and originality. The corresponding author of a manuscript is informed within 45 days after submission that the paper is accepted for publication in the journal, needs revision or is rejected. Revised manuscripts should be resubmitted as soon as possible but not later than 14 days.

Ethical considerations

A paper describing any experimental work with humans should include a statement that the Ethics Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work.

Experiments with animals should be done in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures should be such that animals used in experiments do not suffer unnecessarily. Papers should include details of the procedures and anaesthetics used. The Editors will not accept papers where the ethical aspects are, in their opinion, open to doubt.

Preparation of manuscripts

Manuscripts should be submitted in English. American or British spelling can be used provided that only one spelling style is consistently used throughout. Manuscripts must be typewritten on A4 format (210x297 mm), with double spacing, margins of 25 mm, on one side only, consecutively numbered. Times New Roman font, 12-point size, is required.

Text headings

All headings in the text should be set over to the left hand margin, and text should begin on the next line. Type first level (sectional) headings all in capitals. Second level headings should be typed in small (lower case) letters but with the first letter of each main word a capital. For third level headings, only the first letter of the first word should be a capital. Underline first and second level headings.

FIRST LEVEL TEXT HEADING

Second Level Text Heading

Third level text heading

Manuscripts should be divided into the following sections and order:

Title page, Abstract and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure Legends and Figures.

1. **Title page** contains: title of the paper not longer than 80-100 characters, including spaces and punctuation; full name of the authors and their affiliation; the author responsible for correspondence will be marked by an asterisk, and his full address telephone/fax numbers, and e-mail address will be indicated.
2. **Abstract** must not exceed 250 words and should reflect the content of the study. Following the abstract, a list of 3-10 keywords is essential for indexing purposes.
3. **Introduction** containing a description of the problem under investigation and a brief survey of the existing literature on the subject.
4. **Materials and Methods** provide sufficient detail to allow the work to be reproduced.
5. **Results.** Results should be clear and concise.
6. **Discussion** that enriches but does not repeat Section 3 or 5.
7. **Acknowledgements** (if applicable) containing acknowledgement of technical help and of financial material support.
8. **References** should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in square brackets (e.g. [1], [2-6], etc.). Please note the following examples:

Journals:

Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 2714-2719.

Books:

Theofilopoulos AN. Immune complexes in autoimmunity. In: Bona CA, Siminovitch KA, Zanetti M, Theofilopoulos AN (Eds.) *The Molecular Pathology of Autoimmune Diseases*. Harwood Academic Publishers, Switzerland 1993, pp 229-244.

9. **Tables** with suitable captions at the top and numbered with Arabic numerals should be collected at the end of the text on separate sheets (one page per Table). Footnotes to tables should be marked with a) b) c) etc and *, **, *** should be reserved for p values. Each table must be understood independently of the text. All tables must be cited in the text.
10. **Figures (illustrations)** Figures should be submitted on separate pages at the end of the article (new page for each complete figure). They should be numbered in the order of their appearance with Arabic numerals. Figures should be submitted as TIFF files at a proper resolution as follows: Graphs at 800-1200 dpi; Photos at 400-800 DPI; Color 300-400 DPI. Text in figures should be 8-10 point in size. Each figure must have a separate legend. The legends should not appear under the figures, but be gathered in a separate section (Figure legends). Color figures can only be printed if the author is prepared to pay the cost incurred.
11. **Figure legends** should be supplied at the end of the manuscript, double spaced, with relevant figure numbers, labeling symbol and explanation.

Units of measurement, Symbols and abbreviations

Symbols for physical units should be those of the *Système Internationale (SI) Units*.

Alternative or non-SI units may be used, but these must be defined at their first occurrence in the text.

Nomenclature of Microorganisms

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), must be used for all microorganisms.

Genetic Nomenclature

To facilitate accurate communication, it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body.

Proofs and reprints

Ten reprints of each article and one copy of the journal will be supplied free of charge to the corresponding author.

