

**UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI"**  
**Facultatea de Biologie și Geologie**

**COLCIERU MIRCEA**

**Evaluarea metodelor de diagnostic în infecții cu  
tulpini ale genului *Staphylococcus***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Coordonator științific**

**Prof. Dr. OCTAVIAN POPESCU**

**Cluj- Napoca**

**- 2010 -**

## MULȚUMIRI

Acest studiu a fost realizat în cea mai mare parte la Centrul de Biologie Moleculară, Institutul de Cercetări Experimentale Interdisciplinare din cadrul Universității "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca.

Sunt recunoscător în mod deosebit d-lui *prof. dr. Octavian Popescu* pentru onoarea pe care mi-a acordat-o oferindu-mi șansa de a lucra în acest laborator, pentru modul în care mi-a condus această teză și pentru înțelegerea de care a dat dovadă pe parcursul acestor ani.

Doresc să mulțumesc d-lui *asist. univ. dr. Jakab Endre* care a fost un real sprijin în munca de laborator și un foarte bun colaborator pentru articolele publicate.

De asemenea mulțumesc colegilor și tuturor celor care m-au sprijinit în activitatea mea la Centrul de Biologie Moleculară, în special *dr. Iulia Lupan, dr. Annette Damert, dr. Ioan Băcilă, dr. Beatrice Kelemen, dr. Beatrix Ferencz, drd. Sergiu Chira* pentru sprijinul și sfaturile acordate în laborator și nu numai.

Mulțumesc tuturor colaboratorilor și colegilor din Sibiu în special *dr. Hilma Geta, dr. Elefterescu Marioara* și *dr. Ercuță Vlad* pentru ajutorul acordat la colectarea tulpinilor și identificarea acestora.

Doresc să mulțumesc părinților mei, soției mele *Anca* și fiicei mele *Antonia* care m-au încurajat, m-au sprijinit să finalizez această lucrare și mi-au acordat timpul necesar abordării temei propuse.

## CUPRINS

	<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>GENUL <i>STAPHYLOCOCCUS</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>SCOPUL STUDIULUI.....</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALE ȘI METODE.....</b>	<b>8</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATE ȘI DISCUȚII.....</b>	<b>12</b>
4.1.	Rezultatele identificărilor prin metode clasice.....	12
4.2.	Testarea prin metoda duplex PCR <i>mecA /nucA</i> .....	13
4.3.	Identificarea speciilor de stafilococi coagulază negativi cu ajutorul sistemului comercial de teste biochimice API® STAPH.....	15
4.4.	Valorile concentrației minime inhibitorii pentru oxacilină.....	16
4.5.	Amplificarea genelor reglatoare din regiunea <i>mec</i> ( <i>mecI</i> și <i>mecR</i> ).....	17
4.6.	Secvențializarea genei <i>mecI</i> .....	19
<b>5.</b>	<b>CONCLUZII.....</b>	<b>22</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>23</b>
<b>7.</b>	<b>LISTA PUBLICAȚIILOR.....</b>	<b>26</b>

**Cuvinte cheie:** bacterie, rezistență la chimioterapie, *Staphylococcus aureus*, stafilococ coagulază negativ, PCR.

## INTRODUCERE

Infecțiile cu tulpini ale genului *Staphylococcus* sunt o problemă serioasă în cele mai multe țări. *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent reprezintă unul din cei mai incriminați germeni în infecțiile nozocomiale.

Conduita terapeutică adecvată necesită identificarea rapidă și corectă a acestor tulpini metilino-rezistente. Bineînțeles există metode clasice standardizate pentru determinarea susceptibilității la metilina, dar expresia fenotipică a acestei rezistențe reprezintă un caracter heterogen.

Utilizarea acizilor nucleici ca probe biologice de către microbiologi a devenit frecventă în ultimii ani. Există o varietate de probe ADN folosite în rutina laboratoarelor de diagnostic atât pentru confirmarea culturilor cât și pentru detecția directă a patogenilor din probele biologice.

Tehnicile PCR (Polymerase Chain Reaction) au câștigat o utilizare largă, acestea dovedind o mare sensibilitate și specificitate [Jakab, 2009]. Metodele PCR convenționale care utilizează electroforeza în gel de agaroză pentru a detecta produsele de amplificare, nu sunt bine adaptate pentru screening-ul rapid din cauza numărului limitat de probe ce pot fi analizate pe gel, fiind necesare etape suplimentare pentru încărcare, migrare și interpretare. Astfel considerăm că metodele PCR în timp real sunt mai adecvate acestor determinări. Utilizarea exclusivă a acestor teste moleculare poate conduce pe de altă parte la rezultate fals pozitive în ceea ce privește rezistența, deoarece nu toate tulpinile ce posedă gena *mecA* sunt capabile să exprime produsul acesteia [Miller și colab., 2005].

## 1. GENUL *STAPHYLOCOCCUS*

În anul 1878, Robert Koch observă pentru prima dată prezența unor micrococi în puroi. Doi ani mai târziu, Louis Pasteur izolează microorganismul, iar denumirea de stafilococ datează din anul 1882, când chirurgul Ogston se referă la "un coc formator de ciorchini care constituie cauza unor abcese piogene la om".

Bacteriile din genul *Staphylococcus* sunt coci gram-pozitivi cu diametrul mediu de 0,80  $\mu$ , nesporulați, aerobi și facultativ anaerobi, unii microaerofili, imobili, în froțiul colorat Gram fixând intens violetul de gențiană și apar grupați în grămezi de forma ciorchinelui de strugure, de unde provine și numele genului (*Gr.staphylo* = ciorchine de strugure). Peretele celular, cu un puternic caracter antigenic, are o structură complexă, tristratificată, cuprinzând acizi teichoicii, peptidoglicanul și un strat extern proteic. Membrana celulară cu structură tristratificată conține glicolipide (mono- și diglicozidigliceride), fosfolipide (lizilfosfatidilglicerol) și cardiolipină. Nucleoidul sau regiunea nucleară este reprezentată de o singură moleculă de ADN dublu catenară, asociată cu ARN și proteine [Buiuc și Neaguț, 2008].

În ediția 2004 a Manualului Bergey de Bacteriologie Sistematică, familia *Staphylococcaceae* este încadrată taxonomic ca a VIII-a Familie a Ordinului *Bacillales*, din Clasa III, *Bacilli*, aparținând *Phylum*-ului BXIII, *Firmicutes* al Domeniului *Bacteria*.

Corespunzător celor două categorii principale de mecanisme ale patogenității, stafilococii pot determina în organismul uman, două tipuri majore de manifestări patologice: unul cu caracter invaziv, celălalt cu un caracter toxic. Procesele infecțioase de tip invaziv pot fi întâlnite în cazul foliculitei, furunculului, hidrosadenitei, panarițului, mastitelor, infecții ale plăgilor, angina cu stafilococ, cistite, uretrite, anexite, prostatite, pielonefrite, diseminarea pe cale hematogenă, etc. Toxiinfecțiile stafilococice pot fi: intoxicații alimentare, leziuni de natură toxică și sindromul de șoc toxic.

O caracteristică importantă a stafilococilor este rezistența la chimioterapice. Acestea sunt substanțe cu acțiune specifică asupra diferitelor microorganisme. Acțiunea poate fi de tip bactericid sau bacteriostatic. Mecanismele de acțiune ale chimioterapicelor constau în inhibarea sintezei proteinelor, blocarea replicării și reparării ADN sau intervin în biosinteza peretelui celular. Există bineînțeles mecanisme de rezistență bacteriană la antibiotice: inactivarea prin modificarea centrului activ al antibioticului, modificarea permeabilității și a

transportului membranal, modificarea țintei antibioticului (rezistența la meticilină în cazul genului *Staphylococcus*).

Fenotipurile de rezistență ale stafilococilor la  $\beta$ -lactami sunt datorate unor mecanisme multiple. Rezistența este datorată prezenței unei proteine suplimentare de legare a penicilinei, PBP 2a sau PBP 2', care are o afinitate foarte slabă pentru ansamblul  $\beta$ -lactamilor. Proteina modificată de legare a penicilinei (PBP 2a) este codificată de gena cromozomală *mecA*. Au fost descrise alte trei mecanisme de rezistență la oxacilină nelegate de gena *mecA*. Unele tulpini sunt hiperproducătoare de  $\beta$ -lactamază și anume tulpinile BORSA (*Staphylococcus aureus* borderline), care nu au rezistență intrinsecă (nu produc PBP 2a). În absența genei *mecA* câteva tulpini produc probabil o meticilinază capabilă să hidrolizeze meticilina, a cărei genă nu a fost descrisă. Modificarea altor proteine de legare a penicilinei diferite de PBP 2a, duce la apariția tulpinilor MODSA (*Staphylococcus aureus* modificat). Aceste tulpini prezintă rezistență scăzută la oxacilină și nu produc  $\beta$ -lactamază [Jehl, 2003].

Bazele genetice ale rezistenței la meticilină se găsesc la nivelul SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) care reprezintă o insulă de rezistență la antibiotice, unul dintre cele mai mari elemente genetice mobile și are aproximativ 60 kpb [Ito și colab., 1999; Katayama și colab., 2000]. Aceasta este alcătuită din: complexul genelor *mec* (*mecA*, *mecR1* și *mecI*), un complex ce codifică două recombinaze specifice (*crrA* și *crrB*), transpozonul *Tn544* (codifică rezistența la spectinomycină și eritromicină), o copie a plasmidului *pUB110* (conferă rezistență la kanamicină, tobramicină și bleomicină) flancat de elementele de inserție *IS431*.

Există mai multe tipuri de complexe *mec*: tipul A(1) care prezintă gena *mecA* și genele reglatoare *mecI* și *mecR1* complete și tipul B(2), C(3) sau D(4) la care lipsește gena *mecI* iar gena *mecR1* prezintă deleții ale unor fragmente din ce în ce mai mari [Suzuky și colab., 1993].

## 2. SCOPUL STUDIULUI

Obiectivele lucrării sunt următoarele:

- evaluarea metodelor de diagnostic în infecțiile determinate de tulpini ale genului *Staphylococcus*;
- testarea metodei de diagnostic rapid multiplex PCR *mecA/nucA* pentru lotul de 125 de tulpini studiate;
- determinarea concentrației minime inhibitorii pentru tulpinile metilino-rezistente întâlnite;
- identificarea speciilor de stafilococi coagulază negativi, metilino-rezistenți cu ajutorul testelor biochimice;
- amplificarea genelor reglatoare din regiunea *mec* (*mecI*, *mecRI*);
- determinarea secvențelor pentru gena *mecI* și alinierea acestora cu scopul identificării posibilelor mutații.

### 3. MATERIALE ȘI METODE

Cele 125 de tulpini studiate reprezintă un panel de izolate colectate în Sibiu în perioada iulie 2008 până în ianuarie 2010. În lucrarea de față a fost utilizată tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Microbiologics (Minnesota, SUA).

Mediul cel mai uzual folosit în cadrul experimentelor este mediu Mueller-Hinton agar (Fluka AG, Buchs, Elveția). În vederea izolării ulterioare a ADN-ului s-au întrebuițat câte 5ml de culturi bacteriene din tulpinile de interes cultivate pe Mueller-Hinton broth (Fluka AG, Buchs, Elveția). Pentru determinările concentrației minime inhibitorii (CMI) se va utiliza mediul MHB suplimentat cu cationi și anume 2% NaCl. Cultivarea microorganismelor se va efectua termostatat în mediu aerob la 35-37 °C timp de 18-24 ore.

Diagnosticul de laborator în sistem clasic s-a bazat pe schema de identificare minimală a stafilococilor izolați mai frecvent din procesele infecțioase la om (Centrul Național de Referință pentru Stafilococ). Pentru diferențierea familiei *Micrococcaceae* de familia *Streptococcaceae* se utilizează testul catalazei. Evidențierea activității catalazei se realizează prin punerea în contact a culturii de cercetat cu o picătură de perhidrol diluat 20%. Cultivarea tulpinii de cercetat trebuie făcută pe un mediu solid care să nu conțină sânge. Reacția pozitivă constă în apariția efervescentei și diferențiază cocii Gram pozitivi din familia *Micrococcaceae* de cei din familia *Streptococcaceae*.

Diferențierea genului *Staphylococcus* de alte *Micrococcaceae* se realizează prin evaluarea capacității de metabolizare a glucozei în condiții de anaerobioză, prezentă la stafilococi și absentă la micrococi. Pentru necesitățile curente ale diagnosticului de laborator prezintă importanță identificarea în cadrul genului *Staphylococcus* a speciei *Staphylococcus aureus* de stafilococii coagulază negativi (SCN) cu ajutorul testului coagulazei.

Identificarea definitivă a celorlalte specii de SCN de interes medical din categoria generică *Staphylococcus epidermidis* se poate realiza în diferite moduri. În lucrarea de față aceste tulpini au fost prelucrate cu ajutorul sistemului comercial de teste biochimice API<sup>®</sup> STAPH (bioMérieux SA, Lyon, Franța). Kit-ul comercial de 19 teste poate fi ușor interpretat în termen de 24 de ore, pe baza sistemului lui Kloos și Schleifer. Metoda folosită reprezintă o combinație de teste biochimice și de fermentație, teste de referință pentru identificarea stafilococilor împreună cu o bază de date adaptată [Baldellon și Megraud, 1985]. Fiabilitatea este garantată de către inoculul standardizat cu concentrație bacteriană scăzută (0,5 MF). Galeriile API<sup>®</sup> STAPH sunt alcătuite din benzi care conțin substraturi de testare deshidratate



în microtuburi individuale. Testele sunt reconstituite prin adăugarea în fiecare tub a unei cantități din API® STAPH mediu de cultură, care a fost inoculat cu tulpina respectivă. Banda este apoi incubată timp de 18-24 ore la 35-37°C, după care rezultatele sunt citite și interpretate. În lucrarea de față identificarea a fost făcută cu ajutorul software-ului de identificare versiunea 4.0, prin introducerea caracterelor biochimice obținute (figura nr. 1).

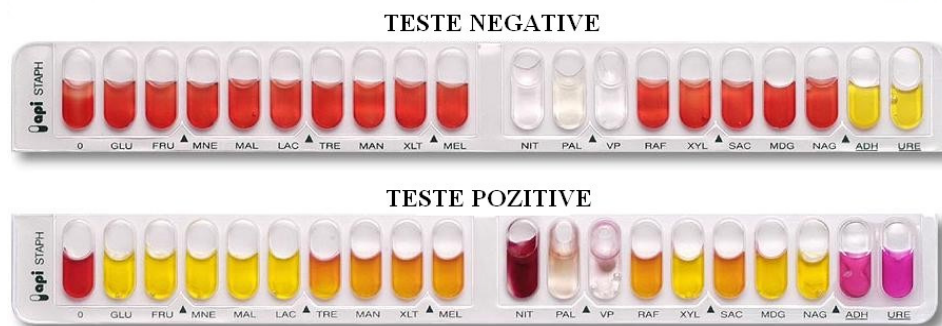


Figura nr. 1. Teste negative și teste pozitive pe galeriile API STAPH.

Un număr redus de tulpini stafilococice prezente în studiu provin din hemoculturi. Acestea au fost izolate în condiții speciale cu ajutorul unor sisteme automate. Sistemul automat VITEK® 2 COMPACT permite identificarea germenilor și testarea sensibilității la antibiotice în câteva ore folosind metoda colorimetrică de citire a cardurilor pentru identificarea speciei bacteriene și turbidimetric pentru testarea sensibilității la antibiotice. Pentru testarea sensibilității la antibiotice sistemul evaluează modelul de creștere al fiecărui microorganism în prezența agentului microbial, comparativ cu godeul martor de creștere. Sunt utilizați mai mulți parametri bazați pe caracteristicile de creștere observate în vederea asigurării datelor adecvate pentru calcularea CMI. Rezultatul CMI trebuie să fie asociat cu identificarea unui microorganism pentru a fi stabilită interpretarea categoriei [Ligozzi și colab., 2002]. Advanced Expert System (AES) reprezintă un sistem destinat gestionării și validării rezultatelor generate de analizor. Acesta permite cunoașterea tiparelor de rezistență la antibiotice cu indicarea fenotipurilor specifice [Colcieru și colab., 2010].

Pentru determinarea CMI la oxacilină/meticilină am folosit metoda microdiluțiilor în medii lichide realizată în plăci de microdiluție, cu o capacitate de 100 μl în fiecare godeu. Am folosit o gamă de 12 diluții cuprinsă între 0,125-256 μg/ml de oxacilină. Valoarea de concentrație a primului godeu în care se observă inhibare totală a creșterii va fi considerată CMI [ESCMID, 2003].

În vederea izolării și purificării ADN- ului am folosit următorul tampon de liză: lizostafină 0,2 mg/ml, Tris/HCl 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1% la pH 8. Ulterior se adaugă proteinaza K și se trece la izolarea și purificarea propriu-zisă folosind kit-ul comercial

NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania). În fazele ulterioare ale studiului s-a folosit un alt kit de purificare și anume NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germania) pentru purificarea din gelul de agaroză a produșilor de amplificare pentru gena *mecl*, în vederea secvențializării acestora. Pentru manevrele mai sus menționate au fost folosite centrifugile: BIOSAN COMBISPIN FVL 2400N și QUALITRON.

Determinarea concentrației și purității ADN-ului a fost efectuată cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop<sup>®</sup>ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, SUA).

Metoda duplex PCR folosită permite amplificarea concomitentă a genei *mecA* (conferă rezistență la meticilină) și a genei pentru termonuclează *nucA* (caracteristică speciei *S. aureus*). Amorsele oligonucleotidice folosite au fost pentru gena *mecA*: MecA<sub>1</sub>-5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC complementar nucleotidelor 1282 până la 1303 și MecA<sub>2</sub>-5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC complementar nucleotidelor 1793 până la 1814, rezultând astfel un fragment de 533 pb [Murakami și colab., 1991]. Pentru gena *nucA* secvența celor două amorse de 21 respectiv 24 baze azotate este: NucA<sub>1</sub>-5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT și NucA<sub>2</sub>-5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC. Amorsele au fost localizate printre cele 447 perechi de baze ale genei *nucA* ce codifică nucleaza termostabilă A; amorsa 1 se situează între nucleotidele +49 și +69, iar amorsa 2 între poziția +304 și +327. Astfel se amplifică un fragment de 279 pb [Brakstad și colab., 1992]. Ambele perechi de amorse au fost sintetizate la Institutul de Cercetări Biologice al Academiei Maghiare de Științe, Szeged, Ungaria.

Pentru amplificarea genei *mecl* (codifică represorul transcripțional MecI) s-a utilizat amorsa MecI<sub>1</sub>-5'-GAAATGGAGTAAATATAATGG situată între pozițiile 48877-48897 și MecI<sub>2</sub>-5'-CTATGTATTGTTGTAAACAC situată între pozițiile 49292-49273, conform secvenței complete *Staphylococcus aureus ssp. aureus* tulpina N513 GenBank numărul BA000018, fragmentul amplificat fiind de 416 pb. Pentru amplificarea genei *mecR1* (codifică receptorul MecR1) s-a utilizat amorsa MecR1<sub>1</sub>-5'-TATTACAAATGTAGTATTTATGTC situată între pozițiile 47073-47796 și MecR1<sub>2</sub>-5'-ATTTCTTCTATTATATTATTCGCA situată între pozițiile 48994-48971, conform aceleiași secvențe, aplicându-se un fragment de 1922 pb. Ambele perechi de amorse au fost sintetizate la Prooligo (Paris, Franța) și Eurogentec (Liege, Belgia).

Amplificările prin metoda duplex PCR prezentate în această lucrare au fost realizate cu următorul amestec de reacție: TP 5x concentrat Green, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (pentru fiecare dezoxiribonucleotid-trifosfat), amorsă NucA<sub>1</sub> 1 μM, amorsă NucA<sub>2</sub> 1 μM, amorsă MecA<sub>1</sub> 1 μM, amorsă MecA<sub>2</sub> 1 μM, 1,25 U polimerază GoTaq<sup>®</sup> Flexi, 10 μl colonii

suspendate sau soluție cu 100 ng ADN și apă ultrapură/UV (Purelab Ultra Genetic, ELGA LabWater, High Wycombe, Marea Britanie) până la un volum final de 50  $\mu$ l. ADN polimeraza, tamponul și clorura de magneziu sunt furnizate în kit-ul comercial GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, SUA). Amestecul de dNTP provine de la același producător. Pentru amplificarea probelor se utilizează aparatele PCR Mastercycler<sup>®</sup> și Mastercycler<sup>®</sup> EP gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germania). Programul folosit pentru aceste aparate a fost: denaturare inițială 5 minute la 94°C, denaturare 30 secunde la 92°C, aliniere 30 secunde la 56°C, elongare 90 secunde la 72°C, 5 minute la 72°C. Etapele 2-4 se repetă de 30 de ori [Jakab și Popescu, 2005].

Pentru amplificarea genelor *mecI* și *mecRI* amestecul de reacție este similar, cu excepția concentrației amorselor specifice MecI<sub>1</sub>, MecI<sub>2</sub>, MecRI<sub>1</sub>, MecRI<sub>2</sub> și anume 0,5  $\mu$ M. Aparatul utilizat pentru aceste reacții este Palm Cycler<sup>™</sup> (Corbett Life Science, Sydney, Australia).

Profilul termic al reacției de amplificare pentru gena *mecI* este: denaturare inițială 5 minute la 94°C, denaturare 30 secunde la 92°C, aliniere 30 secunde la 53°C, elongare 60 secunde la 72°C, 10 minute la 72°C. Etapele 2-4 se repetă de 35 de ori. În cazul genei *mecRI* programul folosit pentru acest aparat a fost: denaturare inițială 5 minute la 94°C, denaturare 60 secunde la 92°C, aliniere 60 secunde la 56°C, elongare 120 secunde la 72°C, 10 minute la 72°C. Etapele 2-4 se repetă de 35 de ori.

Pentru separarea fragmentelor amplificate în cadrul lucrării au fost folosite: cuva CONSORT H<sub>1</sub>-SET cu distanța între electrozi de 10 cm și cuva CONSORT H<sub>U</sub>-10 cu distanța între electrozi de 15 cm. Sursa a fost de tip CONSORT E 835, cu voltaj aplicat de 52 V, respectiv 80 V pentru cuva mare. S-au turnat 50 ml sau 90 ml gel de agaroză 1% (Promega Corporation, Madison, SUA). S-au încărcat în godeuri câte 10  $\mu$ l amestec PCR alături de markeri de greutate moleculară Generuler<sup>™</sup> 100 pb DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Lituania) sau 1 kb DNA Ladder (Axigen Biosciences, Union City, SUA). Sistemul de captare al imaginii a fost de tip UVP GEL DOC-IT IMAGING SISTEM (Cambridge, Marea Britanie).

Secvențializarea genei *mecI* a fost realizată prin metoda Sanger cu ajutorul secvențiatorului automat ABI 3730XL. Probele au fost procesate la Macrogen Inc. (Seul, Coreea). Pentru reacție este nevoie de minim 25  $\mu$ l de soluție de ADN cu concentrația de aproximativ 50 ng/  $\mu$ l. S-a folosit amorsa MecI<sub>2</sub> în concentrație de 10 pmol/  $\mu$ l mai exact 10  $\mu$ M.

## 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 4.1. Rezultatele identificărilor prin metode clasice

Pe durata studiului au fost izolate un număr de 125 de tulpini aparținând genului *Staphylococcus*. Dintre acestea un număr de 64 de tulpini (51,20%) au fost izolate de la pacienți de sex masculin, iar restul, respectiv 61 de tulpini (48,80%) provin de la femei.

Media de vârstă calculată a fost de 57,07 ani. Putem afirma astfel că persoanele cu vârstă relativ înaintată sunt mai susceptibile la infecțiile stafilococice. Unul din motive poate fi considerat scăderea treptată a imunității odată cu înaintarea în vârstă.

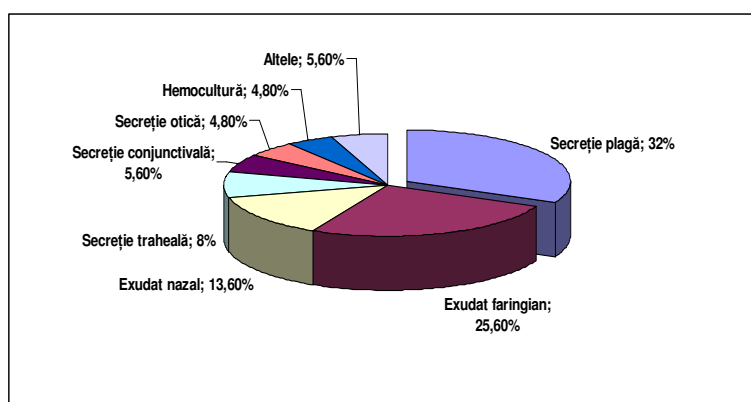


Figura.nr. 2. Ponderea tulpinilor stafilococice izolate în funcție de produsul patologic întâlnit.

În eșantionul luat în studiu se constată că stafilococii pot fi izolați frecvent din secrețiile plăgilor. Se poate concluziona că tulpini ale genului *Staphylococcus* pot fi implicate în apariția infecțiilor nozocomiale.

Cele 125 tulpini bacteriene au fost prelucrate cu ajutorul metodelor clasice: culturi bacteriene, teste biochimice și efectuarea antibiogramei. Au fost identificate 50 de tulpini aparținând speciei *Staphylococcus aureus* și 75 tulpini de SCN.

În continuare cele 125 de tulpini stafilococice identificate prin metode ale bacteriologiei clasice vor fi testate cu ajutorul metodei duplex PCR *mecA/nucA* în vederea verificării cel puțin a rezistenței la meticilină și a apartenenței la specia *Staphylococcus aureus*.

#### 4.2. Testarea prin metoda duplex PCR *mecA/nucA*

Tehnica duplex PCR *mecA/nucA* a fost aplicată celor 125 de tulpini, iar 21,60% dintre acestea au fost *mecA* pozitive; 38,40% din totalul tulpinilor testate au fost pozitive pentru gena *nucA* fiind astfel considerate tulpini de *Staphylococcus aureus*. Restul tulpinilor *nucA* negative sunt reprezentate de alte tulpini de stafilococi coagulază negativi sau pozitivi (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1. Numărul de tulpini și ponderea acestora în funcție de prezența sau absența genelor *mecA/nucA*.

Nr. Crt.	Caracteristica	Nr. Tulpini	Pondere %
1	<i>mecA</i> <sup>+</sup>	27	21,60
2	<i>mecA</i> <sup>-</sup>	98	78,40
3	<i>nucA</i> <sup>+</sup>	48	38,40
4	<i>nucA</i> <sup>-</sup>	77	61,60
5	<i>mecA</i> <sup>+</sup> <i>nucA</i> <sup>+</sup>	13 (MRSA)	10,40
6	<i>mecA</i> <sup>+</sup> <i>nucA</i> <sup>-</sup>	14 (MRSS)	11,20
7	<i>mecA</i> <sup>-</sup> <i>nucA</i> <sup>+</sup>	35 (MSSA)	28,00
8	<i>nucA</i> <sup>-</sup> <i>nucA</i> <sup>-</sup>	63 (MSSS)	50,40

Evaluarea inițială a tulpinilor realizată prin metoda multiplex PCR *mecA/nucA* a constat în amplificarea fragmentelor de interes, proba biologică fiind reprezentată de o suspensie bacteriană realizată dintr-o colonie bacteriană la 10 μl apă pură. Pentru exemplificare este prezentată figura nr. 3.

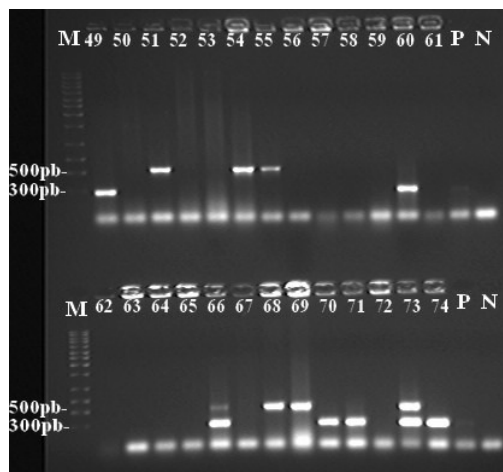


Figura nr. 3. Rezultatele amplificării prin metoda duplex PCR *mecA/nucA* pentru tulpinile 49-74.

Identificările directe din culturi efectuate prin tehnici ale biologiei moleculare au creat totuși suspiciuni legate de eficiența reacției de amplificare, în condițiile în care în amestecul de reacție au fost prezenți și alți constituenți celulari și poate alți inhibitori ai

reacției. Având în vedere aceste motive, după testarea tuturor tulpinilor s-au selectat tulpinile de interes rezistente la meticilină și cele care au prezentat suspiciuni, respectiv tulpinile 1, 8, 9, 15, 20, 25, 26, 27, 33, 47, 51, 54, 55, 60, 66, 68, 69, 89, 92, 96, 97, 99, 106, 107, 111, 116, 117, 119, 124 și s-a efectuat izolarea și purificarea ADN în vederea retestării prin aceeași metodă (figura 4, 5 și 6). Tulpinile cu numărul 73, 75 și 77 deși reprezintă tulpini de interes, nu au crescut în cultură pentru a putea fi testate și prin această metodă.

Tulpina cu numărul 47 este MRSA (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Se poate observa prezența produșilor de amplificare atât pentru gena *mecA* (533 pb) cât și pentru *nucA* (270 pb). O altă tulpină de interes este cea cu numărul 25 pentru care inițial nu a fost semnalată prezența amplificării pentru gena *mecA*. De această dată se poate observa o bandă corespunzătoare genei *mecA* de aproximativ 533 pb, dar nu la fel de intensă ca în cazul tulpinii 47. Cel mai probabil, în cazul tulpinii 25 este vorba despre un caracter de heterogenitate al rezistenței la meticilină [Colcieru și colab., 2010]. De asemenea, tulpina cu numărul 66 este MRSA. Pentru restul tulpinilor, respectiv 1, 8, 9, 15, 20, 26, 33, 51, 54, 55, 68, 69, 89 se poate observa amplificarea fragmentului de aproximativ 533 pb corespunzător genei *mecA* și de aceea pot fi considerate tulpini MRSS (meticillin-resistant *Staphylococcus* strains).

În figura nr. 6 predomină tulpinile MRSA- 96, 99, 106, 107, 111, 116 și 117. Pentru tulpinile 99, 106, 107, 111 și 116 inițial nu a fost semnalate amplificări pentru fragmentul de aproximativ 533 pb corespunzător genei *mecA*. Probele 97, 119 și 124 sunt reprezentate de tulpini MSSA (meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus*).

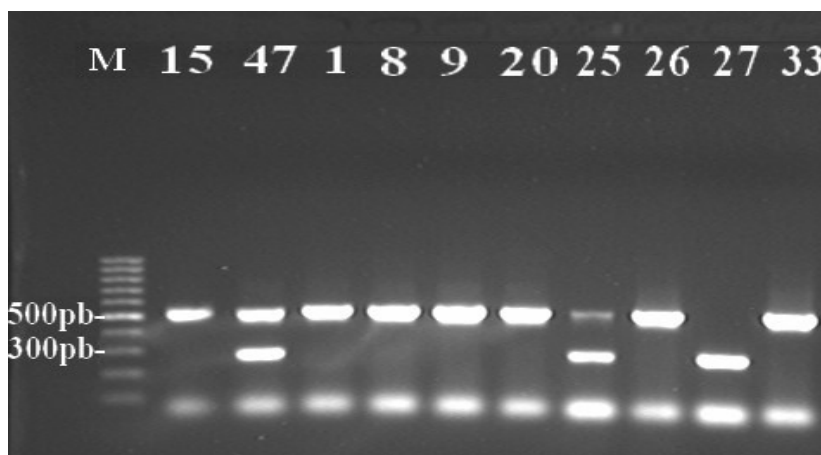


Figura nr. 4. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare pentru tulpinile 1, 8, 9, 15, 20, 25, 26, 27, 33 și 47.

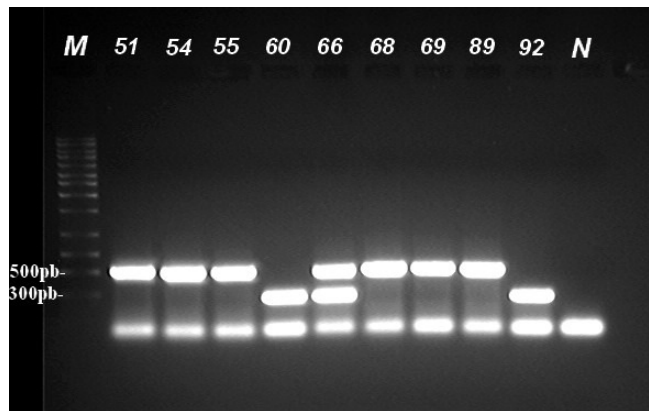


Figura nr. 5. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare pentru tulpinile 51, 54, 55, 60, 66, 68, 69, 89 și 92.

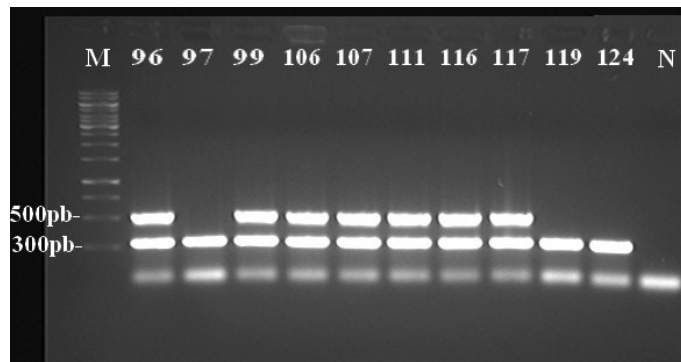


Figura nr. 6. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare pentru tulpinile 96, 97, 99, 106, 107, 111, 116, 117, 119 și 124.

#### 4.3. Identificarea speciilor de stafilococi coagulază negativi cu ajutorul sistemului comercial de teste biochimice API® STAPH

Dintre cele 23 de tulpini metilino-rezistente evidențiate cu ajutorul tehnicilor moleculare, 10 au prezentat amplificare pentru fragmentul de aproximativ 270 pb specific tulpinilor de *Staphylococcus aureus*. Pentru restul de 13 tulpini coagulază negative, identificarea finală a speciilor a fost efectuată cu ajutorul sistemului comercial de teste biochimice API® STAPH. Profilele biochimice rezultate au fost validate cu ajutorul software-ului de identificare API WEB versiunea 4,0. Au fost luate în considerare profilele cu ponderea cea mai mare.

Prelucrarea tulpinii de referință utilizată, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, a generat un profil numeric care a fost tradus printr-o valoare a indicelui de identificare de 90,30%, ceea ce corespunde unei bune identificări. Profilele biochimice cuantificate numeric, împreună cu ponderea identificării pentru fiecare tulpină sunt prezentate în tabelul numărul 2.

Tabelul nr. 2. Speciile bacteriene identificate împreună cu profilele numeice și ponderea identificării pentru fiecare tulpină.

Număr de identificare tulpină	Specia identificată	Produsul patologic din care provine proba	Profil numeric	ID %
1	<i>S. warneri</i>	Secreție plagă	6734113	49,70
8	<i>S. xylosus</i>	Secreție conjunctivală	6735112	91,70
9	<i>S. haemolyticus</i>	Secreție plagă	2635051	97,70
15	<i>S. haemolyticus</i>	Secreție conjunctivală	6733051	82,70
20	<i>S. xylosus</i>	Secreție conjunctivală	6372450	94,70
26	<i>S. xylosus</i>	Secreție plagă	6372400	80,40
33	<i>S. haemolyticus</i>	Exudat nazal	6636051	47,10
51	<i>S. epidermidis</i>	Exudat nazal	6706011	93,20
54	<i>S. epidermidis</i>	Secreție conjunctivală	6706010	91,10
55	<i>S. hominis</i>	Secreție otică	6712052	45,50
68	<i>S. epidermidis</i>	Secreție plagă	6706013	93,10
69	<i>S. epidermidis</i>	Secreție conjunctivală	6706011	93,20
89	<i>S. haemolyticus</i>	Secreție plagă	6616051	53,30
-	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Tulpina de referință	6336173	90,30

#### 4.4. Valorile concentrației minime inhibitorii pentru oxacilină

În cazul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* valorile CMI pentru oxacilină situate sub 2 µg/ml indică sensibilitatea acestora; la valori ale CMI peste 4 µg/ml tulpinile sunt considerate rezistente. În cazul tulpinilor de stafilococi coagulază negativi, dacă valorile CMI pentru oxacilină sunt ≤0,25 µg/ml și ≥0,5 µg/ml acestea sunt definite ca metilino-sensibile, respectiv rezistente [NCCLS, 2003].

În tabelul nr. 3 sunt prezentate valorile CMI determinate prin metoda microdiluțiilor în bulion. Tulpinile selectate în urma identificărilor prin metoda multiplex PCR au fost etichetate ca fiind tulpini metilino-rezistente.

Tabelul nr. 3. Valorile CMI și interpretarea acestora pentru cele 23 de tulpini bacteriene.

Număr identificare tulpină	Specia bacteriană	CMI pentru oxacilină (µg/ml)	Interpretare
1	<i>S. warneri</i>	256	R
8	<i>S. xylosus</i>	0,25	S
9	<i>S. haemolyticus</i>	256	R
15	<i>S. haemolyticus</i>	32	R
20	<i>S. xylosus</i>	16	R
25	<i>S. aureus</i>	16	R



Număr identificare tulpină	Specia bacteriană	CMI pentru oxacilină (µg/ml)	Interpretare
26	<i>S. xylosus</i>	2	R
33	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	128	R
47	<i>S. aureus</i>	128	R
51	<i>S. epidermidis</i>	64	R
54	<i>S. epidermidis</i>	64	R
55	<i>S. hominis</i>	16	R
66	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	R
68	<i>S. epidermidis</i>	64	R
69	<i>S. epidermidis</i>	64	R
89	<i>S. haemolyticus</i>	32	R
96	<i>S. aureus</i>	256	R
99	<i>S. aureus</i>	256	R
106	<i>S. aureus</i>	64	R
107	<i>S. aureus</i>	128	R
111	<i>S. aureus</i>	8	R
116	<i>S. aureus</i>	128	R
117	<i>S. aureus</i>	128	R
-	<i>S. aureus</i> ATCC 25932	0,25	S

Cu o singură excepție (tulpina de *Staphylococcus xylosus* cu numărul de identificare 8) toate tulpinile bacteriene au fost confirmate ca fiind rezistente la oxacilină/meticilină, rezultate care se corelează foarte bine cu cele obținute prin metoda de amplificare a genei *mecA*. Tulpina de control folosită *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 este sensibilă la oxacilină, date care sunt în concordanță cu informațiile din specificațiile ce însoțesc produsul.

#### 4.5. Amplificarea genelor reglatoare din regiunea *mec* (*mecI* și *mecRI*)

Genele *mecI* și *mecRI* sunt gene implicate în mecanismele de reglare a genei *mecA*. În acest caz se consideră că mutații apărute la nivelul acestor gene pot avea efecte asupra nivelului de rezistență la meticilină.

Gena *mecI* a fost amplificată utilizând amorsele *mecI*<sub>1</sub> și *mecI*<sub>2</sub>. Fragmentul așteptat de 416 pb a fost obținut pentru tulpinile cu numărul 9, 15, 20, 25, 55, 96, 99, 106, 107, 116 și 117 (figura nr. 7).

Pentru amplificarea genei *mecR1* au fost utilizate amorsele *mecR1*<sub>1</sub> și *MecR1*<sub>2</sub>. În acest caz fragmentul amplificat preconizat are o lungime de 1922 pb. Acesta a fost obținut pentru tulpinile 9, 15, 20, 25, 96, 99, 106, 107, 116 și 117 (figura nr. 8).

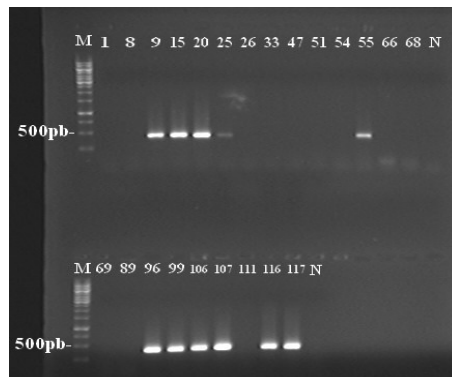


Figura nr. 7. Amplificarea genei *mecI*.

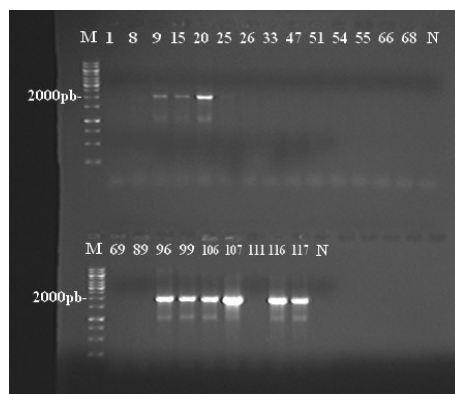


Figura nr. 8. Amplificarea genei *mecR1*.

Rezultatele celor două amplificări sunt în corelație foarte strânsă. Tulpinile care au complexul genelor *mec* în configurație completă, tipul A(1), prezintă fragmente amplificate atât pentru gena *mecI* cât și pentru *mecR1*. Tulpinile care nu prezintă amplificare pentru nici una dintre genele reglatoare, posedă cel mai probabil complexe *mec* de tipul B(2), C(3), sau D(4) [Suzuky și colab., 1993]. În aceste cazuri, deoarece gena *mecR1* este truncată amplificarea nu a avut loc. Excepție face doar tulpina cu numărul 55. Acest caz este unul particular, pentru care nu am găsit date în literatură; este prezent produsul de amplificare pentru gena *mecI* dar nu și pentru *mecR1*. Probabil în cazul acestei tulpini a apărut doar o mutație (deleție) a unui fragment al genei *mecR1* și prezintă un tip nou de complex *mec*.

#### 4.6. Secvențializarea genei *mecl*

Pentru cele 11 probe *mecl* pozitive secvențializarea a fost efectuată la Macrogen Inc. (Seul, Coreea). Datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului BioEdit Sequence Alignment Editor versiunea 7.0.5.3.

După analizarea secvențelor primite am considerat necesară tăierea manuală a primelor 20 de nucleotide și prelucrarea datelor până la nucleotidul cu numărul 388 pentru toate cele 11 probe. Secvențele au fost grupate în funcție de apartenența tulpinilor la grupul stafilococilor coagulază negativi, respectiv la specia *Staphylococcus aureus*.

Secvențele provenite de la tulpinile de *Staphylococcus aureus* au fost aliniate alături de cele ale tulpinilor MRSA252, N315, Mu3 și Mu50 (figura nr. 9). Au putut fi astfel observate mutațiile punctiforme prezente la tulpinile Mu3 și Mu50. Este vorba despre o transverție G-T semnalată pentru poziția 43.

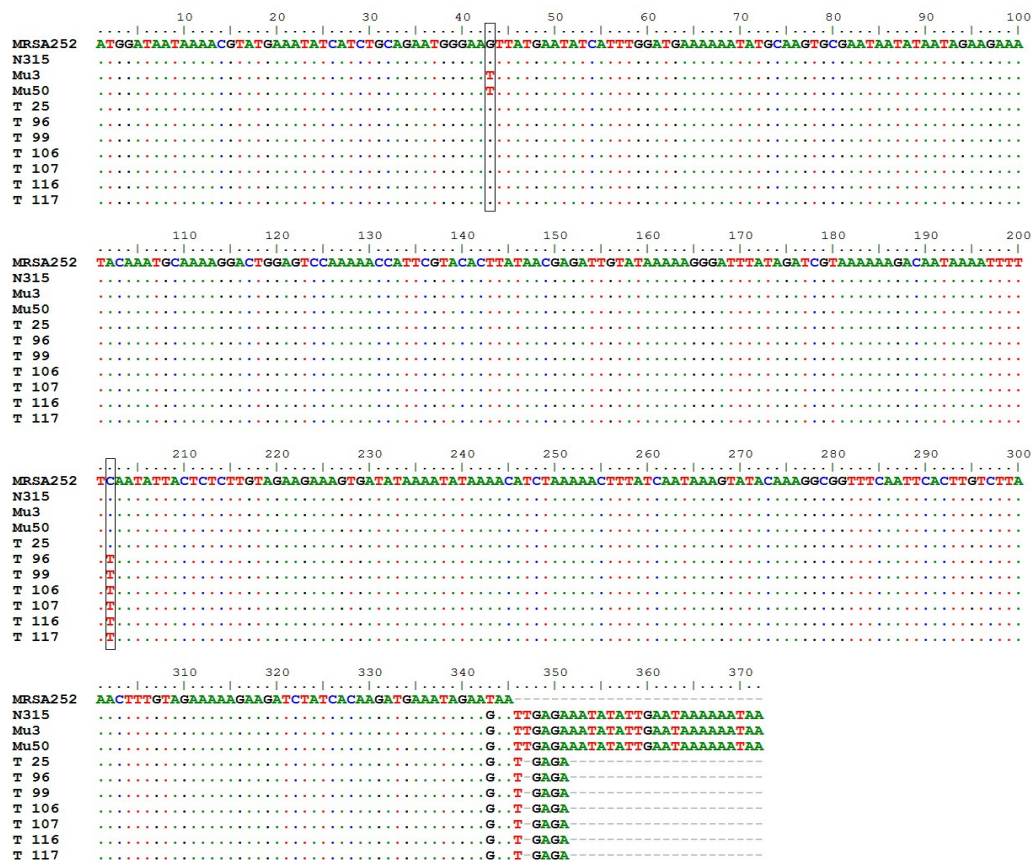


Figura nr. 9. Alinierea secvențelor genei *mecl* pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus* 25, 96, 99, 106, 107, 116 și 117 cu secvențele genei *mecl* ale tulpinilor MRSA252, N315, Mu3 și Mu50. Mutațiile punctiforme sunt evidențiate prin chenare. Numerele de identificare NCBI pentru tulpinile folosite sunt: MRSA252 – 2861158, N315 –1122814, Mu3 –5560220, Mu50 –1120003.

Această modificare afectează doar structura primară a proteinei traduse, nu și funcția ei deoarece se constată o substituție de aminoacizi în poziția 15 și anume fenilalanina înlocuiește valina, ambii aminoacizi fiind de tip hidrofob (figura nr. 10).

În continuare se poate observa tranziția citozinei din poziția 202 cu timina, pentru tulpinile 96, 99, 106, 107, 116 și 117. De această dată structura proteinei rezultate este modificată și anume sinteza este oprită la poziția 68. Glutamina din această poziție (CAA) este substituită cu un codon stop (TAA) [Suzuki și colab., 1993; Kobayashi și colab., 1998; Weller 1999; Klitgaard și colab., 2008].

Pentru a evidenția și mai mult implicațiile acestor mutații au fost calculate punctele izoelectrice și greutatea moleculară pentru cele două două proteine traduse. Astfel pentru tulpina MRSA252 valorile pI/Gm sunt 7,80 respectiv 13680,67. Pentru produsul scurt, cazul tulpinii T 96 de exemplu, valorile pI/Gm sunt 9,48 respectiv 8145,51 [Gasteiger și colab., 2005].

Dacă considerăm inactiv produsul al cărui sinteză este oprită brusc, inhibarea genei *mecA* nu mai are loc pentru tulpinile în care această mutație este prezentă. Datele sunt în strânsă concordanță cu valorile CMI la oxacilină/meticilină determinate pentru aceste tulpini cu valori cuprinse între 64-256 μg/ml.

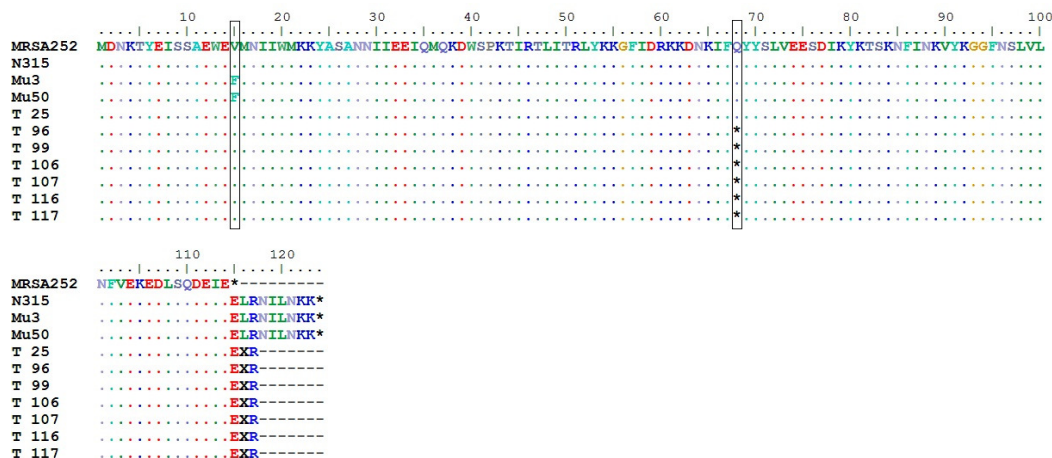


Figura nr. 10. Alinierea secvențelor traduse ale genei *mecI* pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus* 25, 96, 99, 106, 107, 116 și 117 cu secvențele MecI ale tulpinilor MRSA252, N315, Mu3 și Mu50. Mutațiile punctiforme sunt evidențiate prin chenare; asterixul reprezintă un codon stop. Numerele de acces pentru secvențele proteice ale tulpinilor folosite sunt: N315 –BAB41258, MRSA252 –CAG39070, Mu3 -BAF76925, Mu50 –BAB56205.

A fost efectuată o aliniere și pentru secvențele provenite de la tulpinile coagulază negative. În acest caz nu au fost semnalate modificări care pot avea semnificații fenotipice (figura nr. 11). Acestea au fost analizate prin comparare cu tulpina coagulază negativă cunoscută RP62A.

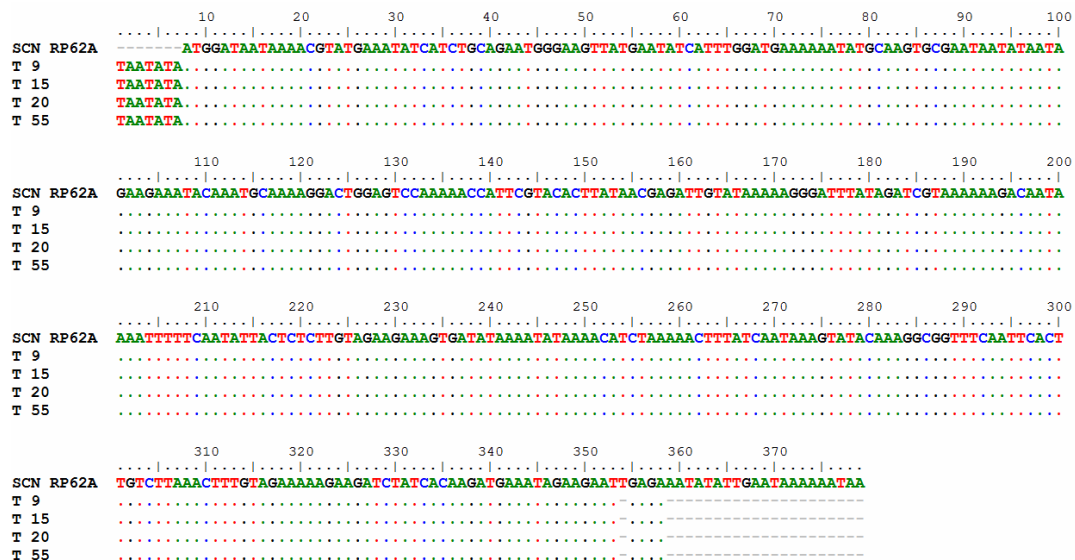


Figura nr. 11. Alinierea secvențelor genei *mecl* pentru tulpinile de SCN 9, 15, 20 și 55 cu secvența genei *mecl* a tulpinii RP62A. Numărul de identificare NCBI pentru tulpina folosită este 3242261.

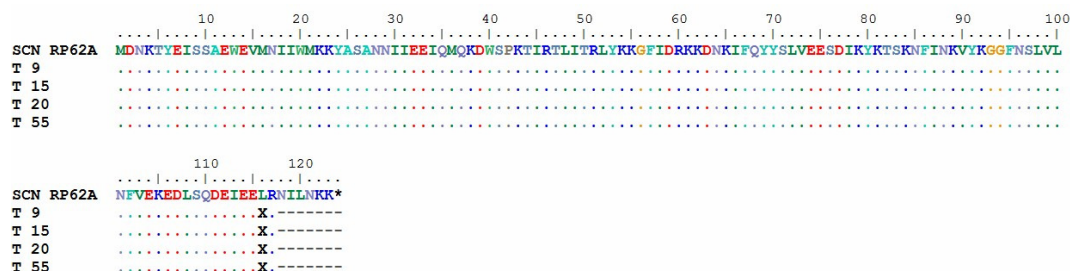


Figura nr. 12. Alinierea secvențelor traduse ale genei *mecl* pentru tulpinile de SCN 9, 15, 20 și 55 cu secvențele Mecl ale tulpinii RP62A. Numărul de acces pentru secvența proteică este AAW53312.

Secvențele pentru proteinele traduse sunt prezentate în figura nr. 12. Trebuie menționat faptul că nepotvirile fie de la începutul secvențelor, fie de la sfârșitul acestora se datorează cel mai probabil erorilor de secvențializare pentru aceste extremități prin prezența decalajelor sau a altor neconformități.

## 5. CONCLUZII

1. În cadrul acestui studiu au fost evaluate metodele de diagnostic în infecțiile datorate genului *Staphylococcus*.

În fazele inițiale am aplicat metodele bacteriologiei clasice, care implică culturi bacteriene, evaluarea caracterelor morfologice și tinctoriale, anumite teste biochimice și efectuarea antibiogramelor prin metoda difuzimetrică.

Ulterior au fost identificate speciile stafilococice implicate cu ajutorul sistemului de teste biochimice API<sup>®</sup> STAPH, un număr mic de tulpini fiind confirmate cu ajutorul sistemului automat VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT.

În final am testat tehnica duplex PCR *mecA/nucA* și am realizat secvențializarea genei *mecI*.

La ora actuală metodele clasice rămân cele mai folosite, deoarece implică costuri mici și pot genera rezultate valide.

Metodele biologiei moleculare implică costuri relativ mari, personal bine instruit, dar pot furniza rezultate reproductibile în timp foarte scurt. Considerăm astfel că în timp metodele moleculare vor pătrunde din ce în ce mai mult în rutina laboratoarelor de diagnostic microbiologic.

2. Cu ajutorul metodelor de microbiologie clasică au putut fi identificate tulpinile de *Staphylococcus aureus* și stafilococii coagulază negativi.

3. Tehnica duplex PCR *mecA/nucA* a fost aplicată celor 125 de tulpini, iar 21,60% dintre acestea au fost *mecA* pozitive; 38,40% din totalul tulpinilor testate au fost pozitive pentru gena *nucA* fiind astfel considerate tulpini de *Staphylococcus aureus*, date care confirmă rezultatele obținute prin metode clasice.

4. Identificările efectuate cu ajutorul sistemului comercial de teste biochimice și de fermentație API<sup>®</sup> STAPH au evidențiat un număr de 4 tulpini de *Staphylococcus epidermidis*, 4 tulpini de *Staphylococcus haemolyticus*, 3 tulpini de *Staphylococcus xylosus*, o tulpină de *Staphylococcus hominis* și o tulpină de *Staphylococcus warneri*.

5. Concentrațiile minime inhibitorii determinate pentru tulpinile selecționate au fost cuprinse între 0,25 și 256 μg/ml oxacilină.

Cu o singură excepție- tulpina de *Staphylococcus xylosus* cu numărul de identificare 8- toate tulpinile bacteriene au fost confirmate ca fiind rezistente la oxacilină/ meticilină, rezultate care se corelează cu cele obținute prin metoda de amplificare a genei *mecA*.

6. Amplificarea genelor reglatoare din regiunea *mec* a evidențiat 11 tulpini *mecI* pozitive și 10 tulpini *mecRI* pozitive.

Rezultatele celor două amplificări sunt în strânsă corelație.

Excepție face doar tulpina cu numărul 55 la care s-a determinat prezența unui produs de amplificare pentru gena *mecI* dar nu și pentru gena *mecRI*. Probabil această tulpină prezintă un tip particular de complex *mec* pentru care nu am găsit date în literatură.

7. Secvențializarea genei *mecI* a evidențiat o singură mutație punctiformă pentru următoarele tulpini de *Staphylococcus aureus*: 96, 99, 106, 107, 116 și 117.

A fost observată tranziția citozinei din poziția 202 cu timina, structura proteinei rezultate fiind modificată, sinteza fiind oprită la poziția 68. Glutamina din această poziție (CAA) este substituită cu un codon stop (TAA).

Proteina MecI cu lanț scurt va fi nefuncțională, iar inhibarea genei *mecA* nu mai are loc. Datele sunt în strânsă corelație cu valorile CMI la oxacilină determinate pentru aceste tulpini.

8. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru elucidarea fenomenelor de rezistență heterogenă a acestor microorganisme la meticilină.

## 6. BIBLIOGRAFIE

**API STAPH, 2002.** Identification system for staphylococci, micrococci and related genera. [package insert] Lyon (Franța): bioMérieux SA.

**Baldellon, C., H., Megraud, F., 1985.** Characterization of *Micrococcaceae* strains isolated from the human urogenital tract by the conventional scheme and a micromethod. *J. Clin. Microbiol* **21**:474-477.

**Brakstad, O., G., Aasbakk, K., Maeland, J., A., 1992.** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of *nuc* gene. *J Clin Microbiol* **30(7)**:1654-1660

**Buiuc, D., Neșuț M., 2008.** Tratat de microbiologie clinică. Editura Medicală. București, pp. 472-474.

**Colcieru, M., Jakab, E., Popescu, O., 2010.** Identificarea rapidă a tulpinilor meticilino-rezistente ale genului *Staphylococcus* cu ajutorul tehnicilor moleculare. *Acta Medica Transilvanica* **2(1)**:72-74.

**Colcieru, M., Jakab, E., Popescu, O., 2010.** Identificarea tulpinilor stafilococice din hemoculturi cu precizarea fenotipurilor de rezistență la  $\beta$ -lactami utilizând sistemul automat VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT. *Acta Medica Transilvanica* **2(2)**:87-89.

**European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2003.** Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution.

**Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A. Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D.**

**Bairoch, A., 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. M. The proteomics protocols handbook. Humana Press, USA, pp. 575-576.

**Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K., 1999.** Cloning and sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43( 6)**:1449-1458.

**Jakab, E., 2009.** Genetic mechanisms involved in the heterogeneous methicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Teză de doctorat, Universitatea Babeș- Bolyai Cluj- Napoca, Facultatea de Biologie și Geologie: 59.

**Jakab, E., Popescu, O., 2005.** Identificarea directă a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină prin amplificarea genelor mecA și nucA. *Analele SNBC* **10**:331-335.

**Jehl, F., Chomarot, M., Weber, M., Gerard, A., 2003.** De l'antibiogramme à la prescription. *Édition bioMérieux*. pp. 80-81.

**Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K., 2000.** A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44(6)**:1549-1555.

**Klitgaard, J., K., Skov, M., N., Kallipolitis, B., H., Kolmos, H., J., 2008.** Reversal of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by thioridazine. *J Antimicrob Chemother* **62**:1215-1221.

**Kobayashi, N., Taniguchi, K., Urasawa, S., 1998.** Analysis of diversity of mutations in the *mecl* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:717-720.

**Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M., G., De Fatima, M., Zuliani, J., Fontana, R., 2002.** Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol* **40**:1681–1686.

**Microbiologics, 2009.** Certificate of analysis: lyophilized microorganism specifications and performance; *Staphylococcus aureus* subsp. aureus ATCC 25932. Minnesota (USA).



- Miller, M., B., Meyer, H., Rogers, E., Gilligan, P., H., 2005.** Comparison of conventional susceptibility testing, penicillin-binding protein 2a latex agglutination testing, and *mecA* real-time PCR for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus Aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus*. *J. Clini. Microbiol* **43**:3450–3452.
- Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S., 1991.** Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clini. Microbiol* **29(10)**:2240-2244.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th edn. Approved Standard M7-A6, Wayne, PA: NCCLS.
- Nucleospin extract II PCR clean-up Gel extraction, 2009.** [user manual] Düren (Germany): Macherey-Nagel.
- Nucleospin tissue DNA purification kit, 2009.** [user manual] Düren (Germany): Macherey-Nagel.
- Suzuki, E., Kuwahara-Arai, K., Richardson, J. F., Hiramatsu, K., 1993.** Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1219-1226.
- Weller, T., M., A., 1999.** The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother* **43**:15-22.

## 7. LISTA PUBLICAȚIILOR

### 1. Articole publicate în reviste de specialitate recunoscute național:

Colcieru, M., Jakab, E., 2009. Identificarea rapidă a tulpinilor metilino-rezistente de *Staphylococcus aureus* cu ajutorul tehnicilor de genetică moleculară. *Pediatru.ro* **16**(4):25-27.

Colcieru, M., Jakab, E., Popescu, O., 2010. Identificarea rapidă a tulpinilor metilino-rezistente ale genului *Staphylococcus* cu ajutorul tehnicilor moleculare. *Acta Medica Transilvanica* **2**(1):72-74.

Colcieru, M., Jakab, E., Popescu, O., 2010. Identificarea tulpinilor stafilococice din hemoculturi cu precizarea fenotipurilor de rezistență la  $\beta$ -lactami utilizând sistemul automat VITEK<sup>®</sup> 2 COMPACT. *Acta Medica Transilvanica* **2**(2):87-89.

### 2. Articole publicate în volumele unor manifestări științifice naționale recunoscute:

Colcieru, M., Jakab, E., 2009. Identificarea rapidă a tulpinilor metilino-rezistente de *Staphylococcus aureus* cu ajutorul tehnicilor de genetică moleculară. *Culegere rezumate. Conferința națională de genetică medicală*:93.

### 3. Alte publicații:

Luca, S., Ercuță, V., Colcieru, M., 2009. Sindrom de citoliză hepatică în ascaridioză. *Zilele medicale Sibiene*.