

Diferențierea infecțiilor bacteriene de cele virale prin chemiluminescență - o abordare translațională

Doctorand: Zaki Milhem

Conducător științific: Prof. dr: Prof. Dr. Ioana Neagoe

Cuvinte cheie: **Infecții virale, infecții infecțioase, infecții virale:** Infecții bacteriene, infecții virale, biomarkeri de stres oxidativ, glutation, feritină, chemiluminescență, specii reactive de oxigen, microARN-uri, biomarkeri de diagnostic, rezistență antimicrobiană, răspunsuri imune, diagnostic molecular.

Tabla de conținut:

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINTELOR

1. Introducere generală în bolile infecțioase

2. Infecțiile bacteriene

2.1. Situația epidemiologică globală a infecțiilor bacteriene

2.1.1. Principalii agenți patogeni și bolile infecțioase asociate

2.2. Mecanisme ale patogenezei bacteriene

2.3. Metode actuale de diagnostic pentru infecțiile bacteriene

2.4. Opțiuni de tratament disponibile pentru infecțiile bacteriene

3. Infecții virale

3.1. Situația epidemiologică globală a infecțiilor virale

3.2. Mecanisme ale patogenezei virale

3.3. Metode actuale de diagnostic pentru infecțiile virale

4. Detectarea pe bază de chemiluminescență a infecțiilor bacteriene și virale

4.1. Introducere generală în chimiluminescență

4.2. Mecanismul generic al chemiluminescenței

4.3. Chimiluminiscența genetică și speciile reactive de oxigen

4.4. Detectarea pe bază de chemiluminescență a infecțiilor bacteriene

4.5. Detectarea pe bază de chemiluminescență a infecțiilor virale

5. ARN-urile necodificatoare și ROS în infecțiile bacteriene și virale

5.1. Comparație moleculară între patogeneza bacteriană și cea virală

5.2. ARNnc implicați în infecțiile bacteriene

5.3. ARNnc implicați în infecțiile virale

5.4. ROS în infecțiile bacteriene și virale

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

1. Ipoteza/obiectivele de lucru

2. Metodologia generală

3. Studiul 1. Evaluarea biomarkerilor de stres oxidativ pentru diferențierea infecțiilor bacteriene și virale: un studiu comparativ al disulfurii de glutation (GSSG) și glutationului redus (GSH) și al feritinei

3.1. 3.1. Introducere

3.2. Ipoteza de lucru

3.3. Materiale și metode

3.4. Rezultate

3.5. Discuții

3.6. Concluzii

4. Studiul 2. Înțelegerea microARN-urilor în contextul infecțiilor bacteriene versus virale

4.1. Introducere

4.2. Ipoteza de lucru

4.3. Materiale și metode

4.4. Rezultate

4.5. Discuții

4.6. Concluzii

5. Studiul 3. MiARN ca biomarkeri pentru infecțiile bacteriene și virale

5.1. Introducere

5.2. Ipoteza de lucru

5.3. Materiale și metode

5.4. Rezultate

5.5. 5.5. Discuții

5.6. Concluzii

6. Discuții generale

7. Concluzii generale

8. Noutate și inovare

REFERINȚE

Introducere

Bolile infecțioase, cauzate de bacterii, virusuri, ciuperci și paraziți, reprezintă aproximativ 25 % din mortalitatea globală, îngreunând semnificativ sănătatea publică. Agenții patogeni bacterieni și virali sunt deosebit de importanți, contribuind la morbiditatea și mortalitatea răspândite la nivel mondial, în special în țările cu venituri mici și medii. Factorii precum răspândirea zoonotică, schimbările de mediu, evoluția microbiană și politicile de sănătate deficitare exacerbează prevalența acestora. În plus, apariția unor noi agenți patogeni, precum SARS-CoV-2, a scos în evidență vulnerabilitățile strategiilor de diagnostic și tratament.

Infecțiile bacteriene

Infecțiile bacteriene provin de la diverși agenți patogeni cu diferite grade de virulență. Simptomele frecvent asociate includ febră, durere localizată, inflamație și oboseală, care adesea se suprapun cu cele ale infecțiilor virale, complicând diagnosticarea. Metode precum diagnosticul pe bază de cultură, reacția în lanț a polimerazei (PCR) și testarea directă a antigenelor sunt standard, dar au limitări semnificative. Metodele bazate pe cultură, deși reprezintă standardul de aur, necesită mult timp, în timp ce PCR și testarea antigenică se confruntă cu provocări în ceea ce privește sensibilitatea și țintirea specifică a agentului patogen.

Opțiunile de tratament includ antibiotice care vizează procese bacteriene precum sinteza peretelui celular și sinteza proteinelor. Cu toate acestea, utilizarea necorespunzătoare și excesivă a antibioticelor a condus la o criză globală a rezistenței antimicrobiene (RAM), care reprezintă în prezent una dintre principalele cauze de deces la nivel mondial. Acest lucru subliniază nevoia urgentă de instrumente de diagnosticare rapide și fiabile pentru a minimiza utilizarea necorespunzătoare a antibioticelor și a îmbunătăți gestionarea infecțiilor bacteriene.

Infecții virale

Virusurile, caracterizate prin natura lor parazitară intracelulară, utilizează mecanismele celulare ale gazdei pentru replicare. Patogeneza lor implică intrarea în celulele gazdă, integrarea genomică și replicarea, ducând adesea la apoptoză și la eludarea răspunsurilor imunitare. Infecțiile virale variază de la cazuri ușoare, cum ar fi răceala comună, la boli grave,

cum ar fi HIV/SIDA și hepatita. Principalele provocări în gestionarea infecțiilor virale includ ratele lor rapide de mutație, care subminează eficacitatea vaccinurilor, și lipsa unor biomarkeri fiabili pentru diagnosticarea precoce.

La nivel mondial, infecțiile virale rămân o provocare majoră pentru sănătate. De exemplu, infecțiile respiratorii precum gripa și COVID-19 sunt responsabile de morbiditate și mortalitate semnificative, cu sute de milioane de cazuri anual. Bolile virale cronice precum HIV și hepatita B/C afectează milioane de persoane în întreaga lume, cu implicații sociale și economice substanțiale.

Provocări și nevoi de diagnosticare

Diferențierea infecțiilor bacteriene de cele virale este esențială pentru un tratament adecvat, deoarece prezentările lor clinice se suprapun adesea. Diagnosticul greșit poate duce la utilizarea necorespunzătoare a antibioticelor, contribuind la RAM. Abordările diagnostice actuale sunt îngreunate de lipsa biomarkerilor cu specificitate ridicată pentru agenții patogeni bacterieni sau virali. Acest lucru evidențiază necesitatea unor noi metode de diagnosticare, inclusiv abordări moleculare precum profilarea miARN și analiza markerilor de stres oxidativ. Aceste metode promit o mai mare precizie în distingerea tipurilor de infecție și în orientarea tratamentelor specifice.

Prin integrarea unor instrumente de diagnosticare inovatoare și îmbunătățirea politicilor de sănătate, povara globală a infecțiilor bacteriene și virale ar putea fi redusă semnificativ, abordând provocările presante de sănătate publică pe care acestea le reprezintă.

Detectarea pe bază de chemiluminescență a infecțiilor bacteriene și virale

Chemiluminescența, emisia de lumină ca rezultat al reacțiilor chimice, a apărut ca un instrument de diagnostic promițător pentru diferențierea infecțiilor bacteriene și virale. Acest fenomen este intrinsec legat de producerea de specii reactive de oxigen (ROS), care sunt mediatori critici ai răspunsului imun al gazdei în timpul infecțiilor. Reacțiile chemiluminiscente implică generarea de lumină prin transferul de energie de la moleculele cu stare excitată formate în timpul proceselor oxidative, un mecanism potențat de prezența unor niveluri ridicate de ERO. În cazul infecțiilor bacteriene, această creștere a ROS este atribuită în principal activării neutrofilelor și activității metabolice bacteriene, creând o semnătură oxidativă distinctă detectabilă prin teste de chemiluminescență. În schimb, infecțiile virale induc producerea de ROS prin mecanisme legate de replicarea virală, disfuncția mitocondrială și deteriorarea celulelor gazdă. Aceste profiluri oxidative diferite permit chemiluminescenței să servească drept metodă rapidă și sensibilă pentru a distinge între infecțiile bacteriene și virale.

ARN-urile necodificatoare și ROS în infecțiile bacteriene și virale

În paralel, ARN-urile necodificatoare (ARNnc) au fost recunoscute ca regulatori pivotali în patogeniza infecțiilor bacteriene și virale, acționând prin mecanisme post-transcripționale complexe. Patogeneza moleculară a acestor infecții variază semnificativ, infecțiile bacteriene provocând răspunsuri inflamatorii prin activarea receptorilor Toll-like (TLR) de către modelele moleculare asociate agenților patogeni (PAMP), în timp ce infecțiile virale stimulează predominant căile imune mediate de interferon. ARNnc specifice, cum ar fi microARN-urile (miARN) și ARN-urile necodificatoare lungi (lncRNA), joacă roluri critice în modularea acestor

proces. În cazul infecțiilor bacteriene, ncRNA-urile reglează inflamația prin direcționarea căilor de semnalizare TLR și a producției de citokine, ajustând răspunsul imun al gazdei. În infecțiile virale, ncRNA-urile influențează procese-cheie precum replicarea virală, evaziunea imunitară și apoptoza, anumite miRNA-uri vizând direct genomurile virale sau modulând răspunsurile celulare ale gazdei pentru a atenua daunele. În plus, producția de ROS, o caracteristică a infecțiilor bacteriene și virale, prezintă modele distincte între aceste două tipuri de agenți patogeni. În timp ce infecțiile bacteriene determină în principal producția de ROS prin activitatea neutrofililor, infecțiile virale induc stres oxidativ prin deteriorarea mitocondrială și activarea imunitară. Aceste diferențe în dinamica ROS, combinate cu rolurile de reglementare ale ncRNA, oferă un cadru robust pentru dezvoltarea de strategii inovatoare de diagnostic și terapeutice pentru a aborda eficient infecțiile bacteriene și virale.

Ipoteza și obiectivele lucrării

Teza explorează ipoteza că speciile reactive de oxigen (ROS), markerii de stres oxidativ, cum ar fi glutatiunul (GSH), forma sa oxidată (GSSG), feritina și ARN-urile specifice necodificatoare (ncRNA), cum ar fi microARN-urile (miARN), pot acționa ca biomarkeri puternici pentru diferențierea infecțiilor bacteriene de cele virale. Acești biomarkeri sunt propuși pentru a aborda problema critică a diagnosticării greșite, care conduce adesea la un tratament inadecvat și la utilizarea excesivă a antibioticelor. Se presupune că chemiluminescența, o tehnică extrem de sensibilă și specifică, va îmbunătăți detecția și precizia diagnosticării acestor markeri prin valorificarea profilurilor lor oxidative și moleculare distincte în timpul infecției. În plus, se anticipează că profilarea miARN va descoperi semnături moleculare unice, oferind o perspectivă mai profundă asupra patogenezei infecțiilor bacteriene și virale.

Obiectivele studiului sunt de a stabili o abordare diagnostică cuprinzătoare și integratoare bazată pe trei studii investigative. Primul studiu se concentrează pe evaluarea markerilor de stres oxidativ, în special GSH, GSSG și feritină, utilizând teste de chemiluminescență. Acești markeri sunt examinați pentru capacitatea lor de a reflecta profilurile distincte de stres oxidativ induse de infecțiile bacteriene și virale. Al doilea studiu investighează expresia diferențiată a miARN-urilor în probele de plasmă, cu scopul de a identifica semnături specifice de miARN asociate cu infecțiile bacteriene și virale. Aceste miARN-uri servesc drept biomarkeri neinvazivi, oferind o diferențiere la nivel molecular între cele două tipuri de infecții. Al treilea studiu analizează rolurile funcționale ale acestor miARN-uri, utilizând platforme microarray de mare capacitate pentru a detecta rețelele de reglementare specifice agenților patogeni. Constatările din acest studiu sunt validate prin PCR cantitativă cu transcripție inversă (qRT-PCR), asigurând fiabilitatea markerilor miARN identificați.

Metodologia generală

Metodologia adoptă o abordare sistematică, începând cu colectarea de probe de sânge, ser și plasmă de la pacienții cu infecții bacteriene și virale, precum și de la controale sănătoase. Pentru măsurarea markerilor de stres oxidativ se utilizează teste de chemiluminescență, care oferă o detecție rapidă și sensibilă a modificărilor legate de ROS în timpul infecțiilor. Pentru profilarea miARN-urilor, se utilizează platforme microarray de mare capacitate, urmate de analize bioinformatică pentru cartografierea căilor moleculare și identificarea miARN-urilor exprimate diferențiat. Metodele statistice, inclusiv regresia logistică, analiza caracteristicilor operaționale ale receptorului (ROC) și calculele zonei sub curbă (AUC), sunt utilizate pentru

a evalua performanța de diagnosticare a acestor biomarkeri. Instrumentele de vizualizare a datelor, cum ar fi hărțile termice și analizele de grup, sunt utilizate pentru a ilustra modele biomarker distincte între tipurile de infecție.

Prin integrarea datelor privind stresul oxidativ și miARN, cercetarea urmărește să dezvolte un cadru de diagnostic rapid, rentabil și precis. Această abordare nu numai că abordează limitările actuale de diagnosticare, dar deține, de asemenea, potențialul de punere în aplicare în contexte clinice, orientând strategiile de tratament personalizate, minimizând utilizarea abuzivă a antibioticelor și îmbunătățind rezultatele pentru pacienți. Descoperirile ar putea deschide calea pentru tehnologii de diagnostic inovatoare, cu implicații ample pentru sănătatea publică și gestionarea bolilor infecțioase.

Studiul 1. Evaluarea biomarkerilor de stres oxidativ pentru diferențierea infecțiilor bacteriene și virale: un studiu comparativ al disulfurii de glutatation (GSSG) și al glutatationului redus (GSH) și al feritinei

Studiul investighează potențialul biomarkerilor de stres oxidativ, în special disulfura de glutatation (GSSG), glutatationul redus (GSH) și feritina, ca instrumente pentru diferențierea infecțiilor bacteriene de cele virale, abordând o lacună critică în diagnosticul clinic. Prin utilizarea testelor de chemiluminescență, cercetarea asigură măsurarea sensibilă și precisă a acestor biomarkeri, permițând o analiză comparativă detaliată a nivelurilor acestora la pacienții cu infecții bacteriene sau virale confirmate. Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative în nivelurile de GSSG și GSH între cele două grupuri, infecțiile bacteriene fiind asociate cu un răspuns pronunțat la stresul oxidativ, reflectat în raporturile modificate GSH/GSSG. Acest raport a apărut ca un marker valoros pentru diferențierea profilelor de stres oxidativ ale infecțiilor bacteriene și virale, oferind un indicator fiabil al diferențelor fiziopatologice subiacente.

Feritina, un marker inflamator bine stabilit, a demonstrat niveluri semnificativ crescute în infecțiile bacteriene comparativ cu cazurile virale, ceea ce corespunde rolului său în răspunsul la inflamație în faza acută. Studiul a evidențiat, de asemenea, utilitatea diagnostică combinată a acestor biomarkeri. Analizele statistice, inclusiv curbele ROC (Receiver Operating Characteristic) și evaluările AUC (Area Under the Curve), au arătat că utilizarea unei combinații de GSSG, GSH și feritină a îmbunătățit precizia de a distinge infecțiile bacteriene de cele virale. În mod specific, abordarea combinată a obținut o putere de discriminare mai mare comparativ cu utilizarea individuală a oricărui biomarker. Aceste constatări subliniază potențialul integrării markerilor de stres oxidativ în fluxurile de diagnosticare pentru îmbunătățirea procesului decizional clinic, reducerea incertitudinii diagnostice și atenuarea utilizării necorespunzătoare a antibioticelor. Studiul concluzionează că acești biomarkeri, în special atunci când sunt analizați colectiv, oferă o bază solidă pentru dezvoltarea unor instrumente de diagnostic rapid, precis și rentabil pentru infecțiile bacteriene și virale. Această abordare ar putea revoluționa gestionarea infecțiilor, permițând tratamente punctuale și direcționate, abordând în același timp provocarea tot mai mare a rezistenței antimicrobiene.

Studiul 2. Înțelegerea microARN-urilor în contextul infecțiilor bacteriene versus virale

Studiul investighează rolul microARN-urilor (miARN-urilor) în distingerea infecțiilor bacteriene de cele virale, valorificând potențialul acestora ca biomarkeri de diagnostic. miARN-urile, molecule mici de ARN necodificatoare care reglează expresia genelor, joacă un rol esențial

în modularea răspunsurilor imune în timpul infecțiilor. Profilurile lor de expresie diferă semnificativ între infecțiile bacteriene și virale, reflectând căile imunitare distincte ale gazdei activate de acești agenți patogeni. Acest studiu se concentrează pe profilarea acestor miARN-uri pentru a identifica semnături unice care ar putea permite diferențierea precisă și rapidă a tipurilor de infecție. Au fost prelevate probe de sânge de la pacienți cu infecții bacteriene, infecții virale și controale sănătoase. ARN-ul total a fost extras, iar nivelurile de expresie miARN au fost cuantificate utilizând matrice qPCR, vizând un grup de miARN-uri implicate anterior în procesele imune și inflamatorii. Expresia diferențială a fost analizată utilizând metoda ΔCt , normalizată față de controalele endogene și evaluată ulterior prin metode statistice, inclusiv analiza curbei Receiver Operating Characteristic (ROC), pentru a evalua performanța de diagnostic.

Rezultatele au evidențiat profiluri distincte de expresie miARN pentru infecțiile bacteriene și virale. Anumite miARN-uri au fost apreciate în mod semnificativ în infecțiile bacteriene, în timp ce altele au prezentat o expresie predominantă în cazurile virale, evidențiind potențialul lor de diagnosticare. De exemplu, anumite miARN-uri au demonstrat o sensibilitate și o specificitate ridicate, analiza ROC indicând valori ale zonei sub curbă (AUC) care susțin fiabilitatea lor ca biomarkeri. În plus, analiza căilor acestor miARN exprimați diferențiat a pus în lumină implicarea lor în mecanisme imune cheie, cum ar fi semnalizarea citokinelor și activarea imunității înăscute, oferind perspective mecaniciste asupra rolurilor lor în timpul infecțiilor. Aceste constatări subliniază promisiunea profilării miARN ca abordare diagnostică rapidă și neinvazivă, abordând nevoia critică de instrumente care pot distinge infecțiile bacteriene de cele virale cu o precizie ridicată. Studiul concluzionează că integrarea diagnosticelor bazate pe miARN în practica clinică ar putea spori precizia diagnosticului, reduce utilizarea necorespunzătoare a antibioticelor și îmbunătăți rezultatele pentru pacienți. Se recomandă validarea suplimentară în cohorte mai mari și în medii reale pentru a stabili utilitatea lor ca parte a fluxurilor de diagnostic de rutină.

Studiul 3. MiARN ca biomarkeri pentru infecțiile bacteriene și virale

Studiul se concentrează pe evaluarea microARN-urilor (miARN) ca biomarkeri pentru diferențierea infecțiilor bacteriene de cele virale, cu scopul de a stabili utilitatea lor în protocoalele de diagnostic rapid și precis. Probele de sânge au fost recoltate de la pacienți cu infecții bacteriene, infecții virale și controale sănătoase, cu criterii stricte de includere pentru a asigura coerența și a minimiza variabilele de confuzie. ARN-ul total a fost extras din aceste probe utilizând protocoale standardizate optimizate pentru randamentul și calitatea miARN. Profilurile de expresie ale miARN-urilor au fost analizate utilizând o combinație de teste bazate pe qPCR și tehnologie microarray, oferind date complete privind valorile ΔCt , calculele $\Delta\Delta Ct$ și modificările fold (FC) în cohortele bacteriene, virale și de control. Au fost efectuate analize statistice, inclusiv ANOVA și teste t, pentru a identifica miARN-urile cu expresie diferențială semnificativă între grupuri. În plus, a fost utilizată analiza curbei Receiver Operating Characteristic (ROC) pentru a evalua precizia de diagnosticare a miARN-urilor individuale și a combinațiilor acestora.

Rezultatele au evidențiat modele distincte de expresie miARN care ar putea diferenția în mod fiabil infecțiile bacteriene de cele virale. Mai multe miARN-uri au fost semnificativ supreglementate în infecțiile bacteriene, cu modificări fold care au depășit 2,5 în comparație cu controalele, în timp ce altele au prezentat o reglare descendentă consecventă în infecțiile

virale. O combinație de miARN-uri specifice a produs o suprafață sub curbă (AUC) de 0,92 în analiza ROC, subliniind precizia lor ridicată de diagnosticare. Aceste constatări subliniază potențialul semnăturilor miARN ca biomarkeri eficienți pentru a distinge între etiologiile bacteriene și virale, oferind o alternativă rapidă și neinvazivă la metodele de diagnosticare tradiționale. În plus, analizele căilor au evidențiat implicarea acestor miARN-uri în reglarea imunității, recunoașterea agenților patogeni și răspunsurile inflamatorii, oferind o perspectivă asupra rolurilor lor biologice în timpul infecțiilor.

Acest studiu subliniază importanța integrării profilului miARN în fluxurile de lucru clinice pentru a îmbunătăți diagnosticarea infecțiilor. O astfel de abordare are potențialul de a reduce întârzierile de diagnosticare, de a permite terapii țintite și de a atenua utilizarea excesivă a antibioticelor, abordând provocarea globală a rezistenței antimicrobiene. Deși rezultatele sunt promițătoare, studiul recunoaște necesitatea validării în cohorte de pacienți mai mari și mai diverse, precum și a studiilor longitudinale pentru a evalua stabilitatea expresiei miARN pe parcursul infecțiilor. Eforturile viitoare se vor concentra pe dezvoltarea instrumentelor de diagnostic la punctul de îngrijire care valorifică acești biomarkeri miARN pentru aplicații clinice în timp real, transformând potențialul gestionarea infecțiilor bacteriene și virale în cadrele medicale.

Discuții generale

Secțiunea **Discuții generale** sintetizează principalele constatări ale tezei, explorând implicațiile acestora atât în context științific, cât și clinic. Cercetarea demonstrează potențialul combinării biomarkerilor de stres oxidativ (GSH, GSSG, feritină) cu profilarea miARN pentru a diferenția infecțiile bacteriene de cele virale. Aceste constatări răspund unei nevoi critice de instrumente de diagnostic rapid și precis, reducând incertitudinea diagnosticului și minimizând utilizarea greșită a antibioticelor. Discuția subliniază modul în care markerii de stres oxidativ au evidențiat modele distincte în infecțiile bacteriene și virale, feritina fiind strâns legată de cazurile bacteriene datorită rolului său în răspunsurile inflamatorii. În mod similar, profilarea miARN a scos la iveală semnături unice de expresie asociate cu căile imune activate de fiecare tip de agent patogen, oferind o înțelegere la nivel molecular a interacțiunii gazdă-agent patogen. Studiul subliniază natura complementară a acestor biomarkeri, pledând pentru integrarea lor în fluxurile de lucru clinice pentru o strategie de diagnostic mai cuprinzătoare și mai eficientă. Limitările studiului sunt recunoscute, inclusiv necesitatea validării în cohorte de pacienți mai mari și mai diverse, precum și integrarea acestor biomarkeri în dispozitivele de diagnostic la punctul de îngrijire.

Concluzii generale

Concluziile generale reafirmă ipoteza conform căreia combinarea markerilor de stres oxidativ și a profilului miARN oferă un cadru de diagnostic solid pentru distingerea infecțiilor bacteriene și virale. Constatările demonstrează că această abordare integrativă oferă o precizie de diagnostic mai mare decât metodele convenționale, abordând o nevoie nesatisfăcută în gestionarea infecțiilor. Teza subliniază potențialul translațional al cercetării, deschizând calea pentru dezvoltarea de instrumente de diagnostic inovatoare care nu sunt doar rapide și rentabile, ci și capabile să fie implementate în practica clinică de rutină.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Secțiunea privind **originalitatea și contribuțiile inovatoare** prezintă aspectele noi ale tezei, subliniind impactul său științific și clinic. Studiul este printre primele care combină în mod sistematic markerii de stres oxidativ și profilarea miARN pentru diferențierea infecțiilor, oferind o abordare dublă a biomarkerilor care sporește precizia diagnosticului. De asemenea, subliniază utilizarea inovatoare a testelor de chemiluminescență pentru măsurarea markerilor de stres oxidativ cu o sensibilitate ridicată. În plus, cercetarea contribuie la domeniul în creștere al diagnosticelor bazate pe miARN prin identificarea unor noi semnături miARN specifice infecțiilor bacteriene și virale și prin elucidarea rolurilor lor în reglarea imunității. Aceste contribuții nu numai că avansează în înțelegerea științifică a patogenezei infecțiilor, dar au, de asemenea, implicații practice semnificative, oferind o bază pentru dezvoltarea de instrumente de diagnostic de nouă generație.

Differentiation of Bacterial and Viral Infections Through Chemiluminescence - A Translational Approach

PhD Candidate: Zaki Milhem

Scientific Supervisor: Prof. Dr. Ioana Neagoe

Keywords: Bacterial infections, viral infections, oxidative stress biomarkers, glutathione, ferritin, chemiluminescence, reactive oxygen species, microRNAs, diagnostic biomarkers, antimicrobial resistance, immune responses, molecular diagnostics.

Table of Contents:

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. General introduction to infectious diseases

2. Bacterial infections

- 2.1. Global epidemiological status of bacterial infections
 - 2.1.1. Main pathogens and associated infectious diseases
- 2.2. Mechanisms of bacterial pathogenesis
- 2.3. Current diagnostic methods for bacterial infections
- 2.4. Available treatment options for bacterial infections

3. Viral infection

- 3.1. Global epidemiological status of viral infections
- 3.2. Mechanisms of viral pathogenesis
- 3.3. Current diagnostic methods for viral infections

4. Chemiluminescence-based detection of bacterial and viral infections

- 4.1. General introduction to chemiluminescence
- 4.2. Generic mechanism of chemiluminescence
- 4.3. Gene Chemiluminescence and reactive oxygen species
- 4.4. Chemiluminescence-based detection of bacterial infections
- 4.5. Chemiluminescence- based detection of viral infections

5. Non-coding RNAs and ROS in bacterial and viral infections

- 5.1. Molecular comparison between bacterial and viral pathogenesis
- 5.2. ncRNAs involved in bacterial infections
- 5.3. ncRNAs involved in viral infections
- 5.4. ROS in bacterial and viral infections

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Work hypothesis/objectives

2. General methodology

3. Study 1. Evaluation of oxidative stress biomarkers for differentiating bacterial and viral infections: a comparative study of glutathione disulfide (GSSG) and reduced glutathione (GSH) and ferritin

- 3.1. Introduction
- 3.2. Work hypothesis

- 3.3. Materials and methods
- 3.4. Results
- 3.5. Discussions
- 3.6. Conclusion

4. Study 2. Understanding microRNAs in the context of bacterial versus viral infections

- 4.1. Introduction
- 4.2. Work hypothesis
- 4.3. Materials and methods
- 4.4. Results
- 4.5. Discussions
- 4.6. Conclusion

5. Study 3. miRNA as biomarkers for bacterial and viral infections

- 5.1. Introduction
- 5.2. Work hypothesis
- 5.3. Materials and methods
- 5.4. Results
- 5.5. Discussions
- 5.6. Conclusion

6. General discussions

7. General conclusions

8. Novelty and innovation

REFERENCES

Infectious diseases, caused by bacteria, viruses, fungi, and parasites, account for approximately 25% of global mortality, significantly burdening public health. Bacterial and viral pathogens are particularly prominent, contributing to widespread morbidity and mortality globally, especially in low- and middle-income countries. Factors such as zoonotic spillovers, environmental changes, microbial evolution, and weak healthcare policies exacerbate their prevalence. Additionally, the emergence of novel pathogens, such as SARS-CoV-2, has highlighted vulnerabilities in diagnostic and treatment strategies.

Bacterial Infections

Bacterial infections arise from diverse pathogens with varying degrees of virulence. Commonly associated symptoms include fever, localized pain, inflammation, and fatigue, which often overlap with those of viral infections, complicating diagnostics. Methods like culture-based diagnostics, polymerase chain reaction (PCR), and direct antigen testing are standard but have significant limitations. Culture-based methods, while the gold standard, are time-intensive, whereas PCR and antigen testing face challenges in sensitivity and pathogen-specific targeting.

Treatment options include antibiotics targeting bacterial processes such as cell wall synthesis and protein synthesis. However, misuse and overuse of antibiotics have driven a global antimicrobial resistance (AMR) crisis, now a leading cause of death worldwide. This emphasizes the urgent need for rapid, reliable diagnostic tools to minimize antibiotic misuse and improve bacterial infection management.

Viral Infections

Viruses, characterized by their intracellular parasitic nature, utilize host cellular machinery for replication. Their pathogenesis involves entry into host cells, genomic integration, and replication, often leading to apoptosis and evasion of immune responses. Viral infections range from mild cases, such as the common cold, to severe diseases like HIV/AIDS and hepatitis. Key challenges in managing viral infections include their rapid mutation rates, which undermine vaccine efficacy, and the lack of reliable biomarkers for early diagnosis.

Globally, viral infections remain a critical health challenge. For instance, respiratory infections like influenza and COVID-19 account for significant morbidity and mortality, with hundreds of millions of cases annually. Chronic viral diseases such as HIV and hepatitis B/C affect millions worldwide, with substantial social and economic implications.

Challenges and Diagnostic Needs

Differentiating bacterial from viral infections is critical for appropriate treatment, as their clinical presentations often overlap. Misdiagnosis can lead to inappropriate antibiotic use, contributing to AMR. Current diagnostic approaches are hindered by the lack of biomarkers with high specificity for either bacterial or viral pathogens. This highlights the need for novel diagnostic methods, including molecular approaches such as miRNA profiling and oxidative stress marker analysis. These methods promise higher accuracy in distinguishing infection types and guiding targeted treatments.

By integrating innovative diagnostic tools and enhancing healthcare policies, the global burden of bacterial and viral infections could be significantly reduced, addressing the pressing public health challenges they pose.

Chemiluminescence-based detection of bacterial and viral infections

Chemiluminescence, the emission of light as a result of chemical reactions, has emerged as a promising diagnostic tool for differentiating bacterial and viral infections. This phenomenon is intrinsically linked to the production of reactive oxygen species (ROS), which are critical mediators of the host's immune response during infections. Chemiluminescent reactions involve the generation of light through energy transfer from excited-state molecules formed during oxidative processes, a mechanism enhanced by the presence of elevated ROS levels. In bacterial infections, this increase in ROS is primarily attributed to neutrophil activation and bacterial metabolic activity, creating a distinct oxidative signature detectable through chemiluminescence assays. In contrast, viral infections induce ROS production via mechanisms linked to viral replication, mitochondrial dysfunction, and host cell damage. These differing oxidative profiles allow chemiluminescence to serve as a rapid, sensitive method for distinguishing between bacterial and viral infections.

Non-coding RNAs and ROS in bacterial and viral infections

In parallel, non-coding RNAs (ncRNAs) have been recognized as pivotal regulators in the pathogenesis of bacterial and viral infections, acting through intricate post-transcriptional mechanisms. The molecular pathogenesis of these infections varies significantly, with bacterial infections eliciting inflammatory responses via toll-like receptor (TLR) activation by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), while viral infections predominantly stimulate interferon-mediated immune pathways. Specific ncRNAs, such as microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs), play critical roles in modulating these processes. In bacterial infections, ncRNAs regulate inflammation by targeting TLR signaling pathways and cytokine production, fine-tuning the host's immune response. In viral infections, ncRNAs influence key processes such as viral replication, immune evasion, and apoptosis, with certain miRNAs directly targeting viral genomes or modulating host cellular responses to mitigate damage. Furthermore, ROS production, a hallmark of both bacterial and viral infections, exhibits distinct patterns between these two types of pathogens. While bacterial infections primarily drive ROS production through neutrophil activity, viral infections induce oxidative stress through mitochondrial damage and immune activation. These differences in ROS dynamics, combined with the regulatory roles of ncRNAs, provide a robust framework for developing innovative diagnostic and therapeutic strategies to address bacterial and viral infections effectively.

Work hypothesis and objectives

The thesis explores the hypothesis that reactive oxygen species (ROS), oxidative stress markers such as glutathione (GSH), its oxidized form (GSSG), ferritin, and specific non-coding RNAs (ncRNAs) like microRNAs (miRNAs), can act as robust biomarkers for differentiating bacterial from viral infections. These biomarkers are proposed to address the critical challenge of misdiagnosis, which often leads to inappropriate treatment and overuse of antibiotics. Chemiluminescence, a highly sensitive and specific technique, is hypothesized to enhance the detection and diagnostic accuracy of these markers by leveraging their distinct oxidative and molecular profiles during infection. Furthermore, miRNA profiling is anticipated to uncover unique molecular signatures, offering deeper insights into the pathogenesis of bacterial and viral infections.

The objectives of the study are to establish a comprehensive and integrative diagnostic approach based on three investigative studies. The first study focuses on evaluating oxidative stress markers, specifically GSH, GSSG, and ferritin, using chemiluminescence assays. These markers are examined for their ability to reflect the distinct oxidative stress profiles induced by bacterial and viral infections. The second study investigates the differential expression of miRNAs in plasma samples, aiming to identify specific miRNA signatures associated with bacterial and viral infections. These miRNAs serve as non-invasive biomarkers, providing molecular-level differentiation between the two infection types. The third study delves into the functional roles of these miRNAs, using high-throughput microarray platforms to detect pathogen-specific regulatory networks. Findings from this study are validated through quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), ensuring the reliability of the identified miRNA markers.

General methodology

The methodology adopts a systematic approach, beginning with the collection of blood, serum, and plasma samples from patients with bacterial and viral infections, as well as healthy controls. Chemiluminescence assays are used to measure oxidative stress markers, providing rapid and sensitive detection of ROS-related changes during infections. For miRNA profiling, high-throughput microarray platforms are employed, followed by bioinformatics analyses to map molecular pathways and identify differentially expressed miRNAs. Statistical methods, including logistic regression, Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis, and Area Under the Curve (AUC) calculations, are utilized to evaluate the diagnostic performance of these biomarkers. Data visualization tools, such as heatmaps and cluster analyses, are used to illustrate distinct biomarker patterns between infection types.

By integrating oxidative stress and miRNA data, the research aims to develop a rapid, cost-effective, and accurate diagnostic framework. This approach not only addresses current diagnostic limitations but also holds the potential for implementation in clinical settings, guiding personalized treatment strategies, minimizing antibiotic misuse, and improving patient outcomes. The findings could pave the way for innovative diagnostic technologies with broad implications for public health and infectious disease management.

Study 1. Evaluation of oxidative stress biomarkers for differentiating bacterial and viral infections: a comparative study of glutathione disulfide (GSSG) and reduced glutathione (GSH) and ferritin

The study investigates the potential of oxidative stress biomarkers, specifically glutathione disulfide (GSSG), reduced glutathione (GSH), and ferritin, as tools for distinguishing bacterial from viral infections, addressing a critical gap in clinical diagnostics. By leveraging chemiluminescence assays, the research ensured sensitive and precise measurement of these biomarkers, enabling a detailed comparative analysis of their levels in patients with confirmed bacterial or viral infections. The results revealed significant differences in GSSG and GSH levels between the two groups, with bacterial infections associated with a pronounced oxidative stress response, reflected in altered GSH/GSSG ratios. This ratio emerged as a valuable marker for differentiating the oxidative stress profiles of bacterial and viral infections, offering a reliable indicator of underlying pathophysiological differences.

Ferritin, a well-established inflammatory marker, demonstrated notably elevated levels in bacterial infections compared to viral cases, aligning with its role in the acute-phase response to inflammation. The study also highlighted the combined diagnostic utility of these biomarkers. Statistical analyses, including Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Area Under the Curve (AUC) evaluations, showed that using a combination of GSSG, GSH, and ferritin enhanced the accuracy of distinguishing bacterial infections from viral ones. Specifically, the combined approach achieved a higher discriminatory power compared to using any individual biomarker alone. These findings underscore the potential of integrating oxidative stress markers into diagnostic workflows to improve clinical decision-making, reduce diagnostic uncertainty, and mitigate inappropriate antibiotic use. The study concludes that these biomarkers, particularly when analyzed collectively, provide a strong foundation for developing rapid, accurate, and cost-effective diagnostic tools for bacterial and viral infections. This approach could revolutionize infection management, enabling timely and targeted treatments while addressing the growing challenge of antimicrobial resistance.

Study 2. Understanding microRNAs in the context of bacterial versus viral infections

The study investigates the role of microRNAs (miRNAs) in distinguishing bacterial from viral infections, leveraging their potential as diagnostic biomarkers. miRNAs, small non-coding RNA molecules that regulate gene expression, play critical roles in modulating immune responses during infections. Their expression profiles differ significantly between bacterial and viral infections, reflecting the distinct host immune pathways activated by these pathogens. This study focuses on profiling these miRNAs to identify unique signatures that could enable accurate and rapid differentiation of infection types. Blood samples were collected from patients with bacterial infections, viral infections, and healthy controls. Total RNA was extracted, and miRNA expression levels were quantified using qPCR arrays, targeting a panel of miRNAs previously implicated in immune and inflammatory processes. Differential expression was analyzed using the ΔCt method, normalized against endogenous controls, and further evaluated through statistical methods, including Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis, to assess diagnostic performance.

The results revealed distinct miRNA expression profiles for bacterial and viral infections. Specific miRNAs were significantly upregulated in bacterial infections, while others showed predominant expression in viral cases, highlighting their diagnostic potential. For instance, certain miRNAs demonstrated high sensitivity and specificity, with ROC analysis indicating Area Under the Curve (AUC) values that support their reliability as biomarkers. Additionally, pathway analysis of these differentially expressed miRNAs shed light on their involvement in key immune mechanisms, such as cytokine signaling and innate immune activation, offering mechanistic insights into their roles during infections. These findings underscore the promise of miRNA profiling as a rapid, non-invasive diagnostic approach, addressing the critical need for tools that can distinguish bacterial from viral infections with high accuracy. The study concludes that integrating miRNA-based diagnostics into clinical practice could enhance diagnostic precision, reduce inappropriate antibiotic use, and improve patient outcomes. Further validation in larger cohorts and real-world settings is recommended to establish their utility as part of routine diagnostic workflows.

Study 3. miRNA as biomarkers for bacterial and viral infections

The study focuses on evaluating microRNAs (miRNAs) as biomarkers for differentiating bacterial from viral infections, aiming to establish their utility in rapid and accurate diagnostic protocols. Blood samples were collected from patients with bacterial infections, viral infections, and healthy controls, with strict inclusion criteria to ensure consistency and minimize confounding variables. Total RNA was extracted from these samples using standardized protocols optimized for miRNA yield and quality. The expression profiles of miRNAs were analyzed using a combination of qPCR-based assays and microarray technology, providing comprehensive data on ΔCT values, $\Delta\Delta\text{CT}$ calculations, and fold changes (FC) across bacterial, viral, and control cohorts. Statistical analyses, including ANOVA and t-tests, were conducted to identify miRNAs with significant differential

expression between the groups. Additionally, Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate the diagnostic accuracy of individual miRNAs and their combinations.

The results revealed distinct miRNA expression patterns that could reliably differentiate bacterial from viral infections. Several miRNAs were significantly upregulated in bacterial infections, with fold changes exceeding 2.5 compared to controls, while others showed consistent downregulation in viral infections. A combination of specific miRNAs yielded an Area Under the Curve (AUC) of 0.92 in ROC analysis, highlighting their high diagnostic accuracy. These findings underscore the potential of miRNA signatures as effective biomarkers for distinguishing between bacterial and viral etiologies, offering a rapid and non-invasive alternative to traditional diagnostic methods. Furthermore, pathway analyses revealed the involvement of these miRNAs in immune regulation, pathogen recognition, and inflammatory responses, providing insights into their biological roles during infections.

This study emphasizes the importance of integrating miRNA profiling into clinical workflows to improve infection diagnostics. Such an approach has the potential to reduce diagnostic delays, enable targeted therapies, and mitigate the overuse of antibiotics, addressing the global challenge of antimicrobial resistance. While the results are promising, the study acknowledges the need for validation in larger and more diverse patient cohorts, as well as longitudinal studies to assess the stability of miRNA expression over the course of infections. Future efforts will focus on developing point-of-care diagnostic tools that leverage these miRNA biomarkers for real-time clinical applications, potentially transforming the management of bacterial and viral infections in healthcare settings.

General Discussions

The **General Discussions** section synthesizes the key findings of the thesis, exploring their implications in both scientific and clinical contexts. The research demonstrates the potential of combining oxidative stress biomarkers (GSH, GSSG, ferritin) with miRNA profiling to differentiate bacterial from viral infections. These findings address a critical need for rapid, accurate diagnostic tools, reducing diagnostic uncertainty and minimizing the misuse of antibiotics. The discussion highlights how the oxidative stress markers revealed distinct patterns in bacterial and viral infections, with ferritin strongly linked to bacterial cases due to its role in inflammatory responses. Similarly, miRNA profiling uncovered unique expression signatures associated with the immune pathways activated by each type of pathogen, providing a molecular-level understanding of the host-pathogen interaction. The study underscores the complementary nature of these biomarkers, advocating for their integration into clinical workflows for a more comprehensive and efficient diagnostic strategy. The limitations of the study are acknowledged, including the need for validation in larger and more diverse patient cohorts, as well as the integration of these biomarkers into point-of-care diagnostic devices.

General Conclusions

The **General Conclusions** reaffirm the hypothesis that combining oxidative stress markers and miRNA profiling provides a robust diagnostic framework for distinguishing bacterial and

viral infections. The findings demonstrate that this integrative approach offers higher diagnostic accuracy than conventional methods, addressing an unmet need in infection management. The thesis emphasizes the translational potential of the research, paving the way for the development of innovative diagnostic tools that are not only rapid and cost-effective but also capable of being implemented in routine clinical practice.

The originality and innovative contributions of the thesis

The section on **Originality and Innovative Contributions** outlines the novel aspects of the thesis, emphasizing its scientific and clinical impact. The study is among the first to systematically combine oxidative stress markers and miRNA profiling for infection differentiation, offering a dual-biomarker approach that enhances diagnostic accuracy. It also highlights the innovative use of chemiluminescence assays for measuring oxidative stress markers with high sensitivity. Furthermore, the research contributes to the growing field of miRNA-based diagnostics by identifying novel miRNA signatures specific to bacterial and viral infections and elucidating their roles in immune regulation. These contributions not only advance the scientific understanding of infection pathogenesis but also have significant practical implications, offering a foundation for the development of next-generation diagnostic tools.