

## Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de stafilococi la câine

### Laboratory diagnosis of infections caused by staphylococci in dogs

Vili Robert Voichițoiu, Viorel Herman, Janos Degi  
Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

Correspondență: [vilirobert@yahoo.com](mailto:vilirobert@yahoo.com)

**Cuvinte cheie:** *Staphylococcus spp.*, ghid practic, infecții  
**Key words:** *Staphylococcus spp.*, practical guide, infections

#### Rezumat

În prezentul referat bibliografic este destinat educației continue a specialiștilor din domeniu. Sunt prezentate metodele utilizate în diagnosticul de laborator al diverselor infecții produse de stafilococi. Autorii prezintă în detaliu metodele de recoltare a probelor, modul în care se realizează transportul, dar și totalitatea examenelor de laborator, unele executându-se fără prea multă dificultate, chiar și în condiții de teren, punând accent pe testele de biologie moleculară. Foarte importante sunt și cele două subcapitole în care se discută diferențierea stafilococilor de alte familii de bacterii, dar și rezistența primilor amintiți la antibiotic, o problemă de actualitate în medicina modernă.

#### Abstract

In this review destined for education of specialists in the field are presented methods used in the laboratory diagnosis of various staphylococcal infections. The authors present in detail the methods of sampling, how the samples are transported, and all laboratory tests, from which, some are done without too much difficulty, even in field conditions, focusing on molecular biology tests. Very important are the two chapters in which are discussed the differentiations between staphylococcus and other bacteria families, but also the antibiotic resistance of the staphylococci, a problem of modern medicine current year.

### 1. Introducere

Stafilococii sunt considerați germeni ubicvitari, de forma rotundă, gram-pozitivi dispuși în grămezi neregulate cu aspect de ciorchine (*staphylos*), cu variații în dimensiuni, comensali ai pielii și mucoaselor la animale și om, însă, curent, se izolează și din sol, aer și apă [6, 7, 28, 29, 31, 36].

Se mai pot găsi, în număr foarte mare în atmosfera încăperilor locuite, în adăposturile de animale, pe diferite obiecte și utilaje. Frecvent sunt izolați din produsele alimentare precum și din fâinurile animale [6, 7, 10, 19, 28, 29, 31, 37].

Stafilococii sunt incluși în familia *Staphylococcaceae*, genul *Staphylococcus*, până în prezent în acest gen sunt recunoscute 71 de specii [14]. În comparație cu alte specii nesporulate, rezistența față de factorii de mediu a stafilococilor este mai mare.

Majoritatea celulelor bacteriene sunt distruse la 60°C în 30 minute, la 70°C în 15 min, unele celule rezistând chiar până la 80°C.

Stafilococii sunt sensibili față de numeroase antibiotice precum: penicilina, tetraciclină, eritromicină, cloramfenicolul, neomicina, dar generează frecvent variante antibiotico rezistente [28, 29, 31, 38].

Stafilococii prezintă sensibilitate la foarte mulți bacteriofagi, fapt care a permis segmentarea lor în lizotipuri.

Lizotipia și-a făcut loc în practica curentă a diagnosticului infecțiilor cu stafilococi la om, mai ales în scopul stabilirii sursei de infecție și a filierei epidemiologice.

Setul internațional de fagi, utilizat în bacteriologia umană, a fost adoptat și pentru stafilococii de origine animală, adăugându-se și fagii specifici pentru stafilococii bovini, pe care i-a propus Davidson în 1965 [6, 7, 29, 31, 39, 40].

Totalitatea infecțiilor ce sunt produse de bacteriile incluse în genul *Staphylococcus*, au primit generic denumirea de stafilococii, putând apare ca infecții supurative localizate sau boli infecțioase bine conturate epidemiologic și morfoclinic [21, 22, 24, 41].

Pentru a putea diagnostica stafilocociile animalelor se vor utiliza mai multe examene, respectiv: epidemiologic, clinic, anatomo-patologic și de laborator.

Prin **examele de laborator** se confirmă aceste infecții și se pun în evidență caracterele fenotipice și genotipice ale stafilococilor izolați de la animale și oameni.

Prin intermediul **testelor de biologie moleculară**, în ultimii ani, au fost detectate mai multe gene care guvernează fie sinteza unor factori de patogenitate, fie rezistența la antibiotice, detașându-se ca importanță gena *mec*, care guvernează rezistența la metilicilină, stafilococii metilicilin-rezistenți fiind considerați bacterii cu risc zoonotic [9, 10, 42].

### 1.1. Examenul bacteriologic

Examenul bacteriologic presupune izolarea, cultivarea și identificarea germenilor bacterieni din diferite produse patologice suspecte.

Spre deosebire de examenul microscopic, care permite decelarea prezenței agentului etiologic, metodele bacteriologice complexe permit, pe lângă izolare și cercetarea diferitelor însușiri biologice care caracterizează agentul patogen, pe baza cărora se poate afirma cu certitudine natura procesului patologic, putând apoi orienta corect măsurile terapeutice de combatere în focar și de profilaxie.

Aceste aspecte au o deosebită importanță epidemiologică, prin intermediul acestor examene evitându-se, de exemplu, darea în consum a unor produse animaliere care pot provoca la om infecții sau toxiinfecții, uneori cu evoluție gravă [40].

Izolarea și identificarea agentului etiologic, din infecțiile stafilococice se realizează prin **examen bacteriologic**.

Și în cazul infecțiilor stafilococice, examenul bacteriologic se execută **ca o metodă complementară** care ajută la

precizarea diagnosticului, prin coroborarea cu rezultatele examenului epidemiologic și clinic [37, 40].

#### 1.1.1. Prelevarea probelor de material patologic

Recoltarea trebuie să se realizeze înaintea administrării de antibiotice și cu respectarea riguroasă a regulilor de antisepsie, atât în ceea ce privește hemocultura, LCR, lichidul articular, urina, dar și în cazul secrețiilor purulente, aspiratul bronșic, exsudatele faringiene și nazale și totodată trebuie să fie făcută de medicul veterinar, sau sub controlul acestuia și numai în cazuri speciale direct de către proprietari, șefi de fermă etc., cu respectarea întocmai a recomandărilor date de personalul de specialitate [29, 31].

Cel mai mare risc este reprezentat de contaminarea accidentală a prelevatelor cu tulpini de *S. aureus* și *S. epidermidis* prezenți la nivelul pielii.

Pentru diagnosticul stafilocociilor, în general, se recoltează probe care vor fi expediate la laborator după cum urmează:

- de la câini și pisici cu piodermatite, dermatite stafilococice, otite, conjunctivite, infecții genitale, pododermatite se recoltează probe de pe piele, păr, mucoase conjunctivală, genitală (secreții auriculare, genitale, conjunctivale, exsudate din papule, pustule, secreții purulente, cruste) sau probe de sânge, pentru determinarea toxinogenezei [9, 42].

Materialele patologice utilizate pentru diagnosticul de laborator al diferitelor boli la animale sunt foarte diversificate în funcție de natura afecțiunii, de faza evolutivă în care se află, în funcție de starea animalului de la care provin și de posibilitățile materiale de examinare [9, 42].

Pentru examenul bacteriologic, dar și bacterioscopic se pot recolta:

- **sânge** atât pentru examinarea sub formă de frotiuri colorate prin metodele Gram sau Giemsa, cât și pentru hemocultură, recoltat prin puncție venoasă, după o

prealabilă aseptie. Se recoltează 5 - 10 ml sânge, în funcție de specie și talia animalului, în eprubete sterile cu anticoagulant sau cu perle de sticlă. Trebuie asigurată o proporție optimă a sângelui față de mediul de însămânțare, pentru a satisface, pe de o parte, neutralizarea efectului bactericid al sângelui și pe de altă parte, condițiile nutritive proprii unei dezvoltări optime. **Această proporție este de 1/20, 1/30.** Pentru a se realiza blocarea acțiunii fagocitare a leucocitelor conținute în sângele însămânțat se poate recurge și la un adaos de **saponină în proporție de 2%**. În caz că animalul de la care provine sângele de examinat a fost supus unui tratament cu penicilină sau sulfamide, este necesar să se adauge 5 mg acid paraamino-benzoic la 100 ml mediu care să neutralizeze efectul inhibitor al acestora. Se poate realiza hemocultura și din sânge coagulat. Transportul sângelui pentru însămânțare trebuie să se realizeze într-un timp cât mai scurt. Incubația se va face la 37 °C și eventual în atmosferă îmbogățită cu CO<sub>2</sub>, se urmărește circa 1 lună, practicându-se periodic subculturi [7, 9, 19, 42].

- **lichid cefalorahidian** se poate recolta cu ace de seringă sterile, în eprubete sterile pe un anticoagulant (ex. heparina), se vor realiza frotiuri din sedimentul lichidului cefalorahidian care vor fi colorate Gram sau Giemsa. Cel puțin **0,5 ml** de lichid cefalorahidian se însămânțează în bulion glucozat și pe plăci cu geloză cu sânge [7, 19, 9, 42].
- **urina** trebuie recoltată în recipiente sterile. De la femele se va realiza recoltarea prin cateterism, în acest fel evitându-se ca germenii de pe căile urinare să falsifice rezultatele examenului. Urocultura este de dorit să se efectueze și ea cât mai rapid după recoltare. Frotiurile vor fi colorate Gram sau Giemsa. Deasemenea, se vor însămânța, direct **3-4 picături** de urină luate cu pipeta Pasteur, pe suprafața

unei plăci cu geloză simplă și una cu geloză cu sânge, după care se dispersează cu ansa pe toată suprafața mediului de cultură. Se repetă procedura și cu sedimentul obținut prin centrifugarea a 10 ml urină timp de 10 minute la 3000 rotații/min [29].

- **secrețiile** (oculare, nazale, vaginale, otice, etc.) vor fi recoltate cu tampoane sterile pregătite pentru acest scop. Se efectuează frotiuri colorate Gram și Giemsa. Pentru examenul bacteriologic, însămânțarea se efectuează direct cu tamponul cu care s-a făcut recoltarea, atât pe mediul lichid cât și pe cel solid. Tampoanele mai pot fi spălate în ser fiziologic steril din care ulterior se fac însămânțările pe aceleași medii [29].
- **lichidele patologice** de puncție se vor recolta asemănător cu sângele, în eprubete sau recipiente sterile. Frotiurile realizate vor fi colorate Gram și Giemsa. Însămânțarea va fi **directă**, fie se așteaptă să apară sedimente din care ulterior se fac însămânțări [7, 19].
- **materiile fecale** vor fi recoltate în vase sterile urmând ca însămânțarea să se facă în timpul cel mai scurt. Se însămânțează direct pe medii de cultură.
- **organele cu leziuni** vor fi trimise la laborator, preferabil întregi sau fără a fi scoase din cadavrul respectiv, pentru ca însămânțarea să se facă în cele mai bune condiții;

## 1.2. Transportul probelor

### 1.2.1. Condițiile de ambalare și transport

Indiferent de natura materialului patologic recoltat și de scopul examenului, pentru ambalare, expediere, păstrare (dacă este cazul) este necesar să se respecte următoarele norme de lucru:

- Cadavrele, produsele patologice sau organele recoltate de la cadavre se vor expedia la laborator, în cel mai scurt timp după moarte, deoarece procesele de putrefacție creează întotdeauna dificultăți în diagnosticul bacteriologic,

- uneori fiind imposibil efectuarea acestui examen, datorită prezenței florei bacteriene de putrefacție;
- Recoltarea probelor trebuie realizată în așa fel încât materialul să fie cât mai puțin expus contaminării cu germeni din mediul ambiant;
  - În cazul în care prelevarea nu a putut fi efectuată înainte de începerea aplicării terapiei cu antibiotice, se va nota pe buletinul de trimitere antibioticul folosit și doza aplicată;
  - Dacă prelucrarea nu se poate face din cadavre sau organe proaspete, sau atunci când transportul durează un timp mai îndelungat, este obligatorie asigurarea unei temperaturi scăzute (în jur de 0°C) pentru materialele respective, care se poate realiza prin menținerea materialelor în frigidere, lăzi izoterme etc. sau se transportă în recipiente speciale cu gheață;
  - În cazul în care în materialul patologic recoltat există floră asociată se vor folosi lichide conservante care, prin conținutul lor, în substanțe bacteriostatice, sau substanțe tampon, opresc dezvoltarea florei saprofite;
  - Ambalarea materialelor patologice în vederea transportului la laborator se va executa în așa fel încât să asigure o cât mai strictă etanșeitate, pentru a se evita răspândirea germinilor;
  - Indiferent de natura materialului, probele destinate examenului bacteriologic trebuie să fie însoțite de note anamnetice cât mai explicite și mai detaliate din partea medicului privind evoluția bolii, situația epidemiologică, descrierea leziunilor etc.;
  - Doar persoalul instruit poate realiza transportul produselor.
  - Transportul probelor recoltate se face cât mai repede la laborator folosind mediile de transport gelozate sau recipiente sterile corespunzătoare: urocultoare, coprocultoare, tampoane pentru exudat faringian sau nazal etc. [29, 54].

Recoltarea, ambalarea și transportul probelor de material patologic, prelevate de la animale, sunt reglementat prin Ordinul ANSVSA 25/03/2008 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind metodologia de prelevare, prelucrarea primară, ambalare și transport al probelor destinate examenelor de laborator în domeniul sănătății animalelor, fiind însoțite de un document sanitar veterinar legal [54].

### 1.2.2. Mediile de transport

În unele circumstanțe, materialele patologice prelevate sunt păstrate în medii nutritive până la prelucrarea lor în laborator.

**Mediul de transport universal Stuart** este un mediu non-nutritiv, semisolid, ce protejează mult microorganismele de efectele autolitice și letale ale oxidării (hemofili, salmonelle, coli, stafilococi, streptococi, pneumococi). O deficiență a acestui mediu este faptul că nu se poate controla eficient înmulțirea coliformilor contaminanți existenți în mediu. Mediul conservat la 4°C, se poate utiliza timp de un an [25].

#### Compoziția mediului:

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| Tioglicolat de sodiu   | 1,000 g;      |
| Glicerofosfat de sodiu | 10,000 g;     |
| Clorură de calciu      | 0,100 g;      |
| Albastru de metilen    | 0,002 g;      |
| Agar                   | 3,000 g;      |
| Apă distilată          | ad 1000,0 ml. |

Aceste substanțe se amestecă cu apa distilată, se dizolvă prin încălzire și se repartizează în tuburi de sticlă de 13/100 mm cu capac înșurubat în volume de 7 ml.

Se autoclavează 15 minute la 121°C cu capacul deșurubat, iar înainte de solidificare se înșurubează capacele.

Tamponul cu material patologic prelevat se va introduce adânc în mediu, retezând tija tamponului la nivelul orificiului, după care se înșurubează capacul.

Cu ajutorul mediului Stuart se asigură supraviețuirea bacteriilor 24-72 ore [30].

#### **Mediul de transport universal Amies.**

Bazându-se pe principiul mediului Stuart, mediul Amies a fost ameliorat prin schimbarea glicerofosfatului cu o soluție tamponată de săruri anorganice, care delimită multiplicarea

coliformilor de contaminare, de asemenea, nu conține indicator redox. Pentru bacteriile mai puțin fragile, mediul poate fi folosit și fără cărbune [30].

#### Compoziția:

|                            |               |
|----------------------------|---------------|
| Tioglicolat de sodiu       | 1,00 g;       |
| Clorură de sodiu           | 3,00 g;       |
| Clorură de potasiu         | 0,20 g;       |
| Clorură de calciu          | 0,10 g;       |
| Clorură de magneziu        | 0,10 g;       |
| Fosfat diacid de potasiu   | 0,20 g;       |
| Fosfat acid de disodiu     | 1,15 g;       |
| Cărbune farmaceutic neutru | 10,00 g;      |
| Agar                       | 4,00 g;       |
| Apă distilată              | ad 1000,0 ml. |

Aceste substanțe se amestecă în apa distilată și se dizolvă prin încălzire la fierbere. Se ajustează pH-ul la 7,3 ±0,2 și se repartizează mediul în volume de 7 ml în tuburi de sticlă de 13/100 mm cu capac înșurubat.

Se autoclavează mediul astfel obținut 15 minute la 121 °C cu capacul deșurubat, iar înainte de solidificare se înșurubează capacele și se întorc de câteva ori tuburile cu capacul în jos pentru suspensionarea cărbunelui în mediu.

Tamponul cu proba de material patologic prelevat se introduce în profunzimea mediului, se retează tija la nivelul orificiului tubului și se înșurubează capacul. Conservat la 4 °C, mediul Amies poate fi utilizat timp de 12 luni [30].

## 2. Examenul bacteriologic

### 2.1. Mediile de cultură utilizate

Pentru a obține culturi de stafilococi se vor folosi următoarele medii de cultivare (neselective și selective):

- agar-sânge,
- bulion tioglicolat,
- agar hiperclorurat cu manitol și roșu fenol (mediu tip Chapman),
- agar Vogel-Johnson,
- agar Baird-Parker,
- agar Columbia cu colistin și acid nalidixic,

totodată, putându-se utiliza ca mediu diferențial bulionul trehaloză - manitol și / sau

agarul trehaloză-manitol (fosfat), pentru orientarea într-o singură etapă a diagnosticului de specie.

### 2.1.1. Mediile uzuale

**Mediile de cultură lichide**, respectiv diferitele tipuri de bulion, sunt mai rar utilizate în izolarea stafilococilor din probele prelevate de la animale.

Izolarea stafilococilor în medii lichide prezintă unele avantaje:

- este cea mai sensibilă metodă de izolare *in vitro*, deoarece cultura poate fi inițiată de un număr redus de stafilococi;
- neutralizează prin diluție factorii antimicrobieni existenți în probele prelevate destinate examinării [6, 38].

**Bulionul infuzie standard de carne** este un mediu nutritiv, de uz general, pentru cultivarea bacteriilor nepretențioase nutritiv, inclusiv a stafilococilor.

#### Compoziția:

|                  |         |
|------------------|---------|
| Triptonă         | 10,0 g; |
| Extract de carne | 5,0 g;  |
| Clorură de sodiu | 5,0 g.  |

Mediul deshidratat, în cantitate de 20 grame, se va dizolva într-un litru de apă distilată și se va omogeniza ușor până la diluarea completă. Se va regla pH-ul la 7,2 ±0,2 și se va repartiza în tuburi sau flacoane. Se sterilizează prin autoclavare la 121 °C timp de 15 min [50].

**Mediile solide** menite izolării stafilococilor pot fi neselective, diferențiale și selective.

**1) Agarul nutritiv standard** este un mediu neselectiv, uzual, ce prilejuiește creșterea unui număr mare de bacterii, inclusiv a stafilococilor. Pe acest mediu se poate pune în evidență forma, dimensiunea și pigmentogeneza coloniilor de stafilococi.

**2) Agarul îmbogățit cu 5% sânge de berbec** reprezintă mediu neselectiv, fiind cel mai folosit mediu solid pentru însămânțarea probelor prelevate și destinate izolării stafilococilor. Pe acest mediu este evidențiat și tipul de hemoliză.

**3) Mediile diferențiale** înglobează substratul pentru o anumită enzimă sau citotoxină bacteriană și un indicator care

denotă atacarea acestui substrat. În această manieră sunt favorizate izolarea și identificarea preliminară în primocultură a unor specii de stafilococi din probele prelevate, respectiv a stafilococilor manită pozitivi.

**4) Mediile selective** includ substanțe care inhibă dezvoltarea altor bacterii. Există o diversitate de medii selective în raport cu diversitatea bacteriilor patogene, în cazul stafilococilor cel mai utilizat fiind mediul Chapman (NaCl 75 g la 1000 ml mediu) [7, 47].

**Agarul nutritiv standard** reprezintă un mediu de cultură universal pentru bacterii nepretențioase.

**Compoziția:**

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| Extract de carne  | 3,0 g;       |
| Peptonă din carne | 5,0 g;       |
| Agar              | 15,0 g;      |
| Apă distilată     | ad 1000,0 ml |

Ingredientele enumerate mai sus se amestecă și se dizolvă la cald, după care se ajustează pH-ul la 6,8, fiind apoi repartizate în recipiente de sticlă de diferite volume, apoi se autoclavează 15 minute la 121°C. Pentru examenele bacteriologice curente agarul se topește și se toarnă în plăci Petri [7].

**Agarul cu sânge** (5%, 10%) este un mediu des utilizat în laborator pentru bacteriile mai pretențioase, ce cresc greu sau deloc pe agar nutritiv. Mediile de bază pentru prepararea agarului cu sânge sunt reprezentate de agarul Columbia, agarul infuzie de cord, agarul cu tripticază din soia, agarul triptoză și pot fi alese în raport cu exigențele stafilococilor.

Agarul cu sânge are și capacități diferențiale, respectiv detectează activitatea hemolitică a diferitelor specii de stafilococi [7, 47].

**Compoziția:**

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| sânge defibrinat de berbec | 0,5 ml sau 1 ml; |
| agar nutritiv bază         | 9,5 ml sau 9 ml. |

Se topește agarul bază și se răcește în baie de apă la 50°C, iar în final se alătură în baie de apă și tubul sau fiola cu sânge pentru a le egaliza temperatura.

Se amestecă aseptice sângele cu agarul printr-o agitare blândă pentru a se evita

formarea bulelor de aer, după care se toarnă mediul în plăci Petri [7].

### 2.1.2. Mediile speciale

**Mediul Chapman** (agar hiperclorurat cu manită și roșu fenol) este un mediu selectiv utilizat pentru izolarea stafilococilor din prelevate contaminate și pentru diferențierea speciilor manită pozitive.

Prezența concentrației mare de sare asigură inhibarea creșterii bacteriilor non-halotolerante. Degradarea manitei este caracteristică pentru *Staphylococcus aureus subsp. aureus* și poate fi prezentă la unele specii coagulază-negative.

**Compoziția:**

|                  |               |
|------------------|---------------|
| Peptonă          | 10,0 g;       |
| Extract de carne | 1,0 g;        |
| Clorură de sodiu | 75,0 g;       |
| D-manită         | 10,0 g;       |
| Roșu fenol       | 25,0 mg;      |
| Agar             | 15,0 g;       |
| Apă distilată    | ad 1000,0 ml. |

Prin încălzire blândă se dizolvă ingredientele, după care se ajustează pH-ul la 7,4-7,5. Se repartizează câte 20 ml în tuburi 20/200 mm sau 100 ml per flacon.

Se autoclavează mediul 15 minute la 121°C, iar apoi se toarnă în plăci Petri, care după răcire și uscare se închid ermetic în pungi de polietilenă fiind, astfel, conservate o lună, la 4°C [7, 47].

**Mediul Baird Parker** este un alt tip de mediu selectiv-diferențial utilizat pentru izolarea stafilococilor. Clorura de litiu și teluritul de potasiu determină inhibarea creșterii altor specii bacteriene, în timp ce piruvatul și glicina impusionează selectiv creșterea stafilococilor.

**Compoziția:**

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| Peptonă din cazeină               | 10,0 g;   |
| Extract de carne                  | 5,0 g;    |
| Extract de levură                 | 1,0 g;    |
| Piruvat de sodiu                  | 10,0 g;   |
| Glicină                           | 12,0 g;   |
| Clorură de litiu                  | 5,0 g;    |
| Emulsie de gălbenuș de ou-telurit | 50,0 ml;  |
| Sulfametazină soluție 0,2%        | 25,0 ml;  |
| Agar                              | 15,0 g;   |
| Apă distilată                     | 925,0 ml. |

Se va recurge la amestecarea substanțele solide în apă și se vor dizolva prin încălzire, prin fierbere, după care se va ajusta pH-ul la 7,0. Se vor repartiza în tuburi de 20/200 mm, în volume de 19 ml, autoclavându-se apoi 15 minute la 121 °C. Mediul se răcește la 45-50 °C, se adaugă și se omogenizează 1 ml din emulsia de gălbenuș de ou-telurit și se toarnă în plăci Petri, care se închid ermetic în pungi de polietilenă fiind, astfel, conservate o lună, la 4 °C [7].

**Mediul Vogel - Johnson** este un mediu selectiv pentru izolarea stafilococilor din prelevatele hipercontaminate și diferențial pentru stafilococii manită-pozitivi.

Teluritul de potasiu, clorura de litiu și glicina inhibă bacteriile de asociație. Inhibarea slabă a stafilococilor prin aceste ingrediente este compensată de prezența manitei și a glicinei.

Speciile care realizează degradarea manitei (*S. aureus subsp. aureus* și unii stafilococi coagulază negativi) emit acid care virează roșu fenol în galben. De asemenea, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* reduce teluritul de potasiu la telur metalic și formează colonii negre.

#### Compoziția:

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| Peptonă de cazeină       | 10,0 g;    |
| Extract de drojdie       | 5,0 g;     |
| Fosfat diacid de potasiu | 5,0 g;     |
| D-manită                 | 10,0 g;    |
| Clorură de litiu         | 5,0 g;     |
| Glicină                  | 10,0 g;    |
| Roșu fenol               | 25,0 mg;   |
| Agar                     | 15,0 g;    |
| Apă distilată            | 1000,0 ml. |

Prin încălzire timp de 30 minute la 100 °C, ingredientele se vor dizolva, agitându-se la intervale de 5 minute. Mediul se ajustează la pH-ul de 6,8 și se autoclavează 15 minute la 121 °C. Se răcește, apoi, la 50 °C, se adaugă și se omogenizează un volum de 20 ml soluție 1% de telurit de potasiu sterilizată prin filtrare.

Mediul adiționat numai cu 10 ml soluție de telurit este mai puțin selectiv. Se toarnă mediul în plăci Petri și se conservă la 4 °C în pungi de polietilenă închise etanș, fiind utilizat timp de o lună de la turnare [7].

**Agarul Difco cu 1% maltoză și albastru de bromcrezol** e folosit pentru diferențierea lui *S. aureus subsp. aureus* care realizează fermentarea maltozei și produce acid, virând culoarea mediului spre galben față de *S. intermedius*, care nu fermentează maltoza.

#### 2.1.3. Caracterele de cultivare

Pe medii uzuale, în condiții de aerobioză, în general, germenii din genul *Staphylococcus* se dezvoltă ușor, în 18-24 de ore. Ca și factori indispensabili creșterii lor, amintim vitamina B1 și acidul nicotinic. Pentru formele cu deficiențe ale peretelui celular este nevoie de mediu hipertonic, pentru a supraviețui și a se multiplica. Este cunoscut faptul că stafilococii suportă variații mari de temperatură și pH la creștere, dar temperatura optimă este de 37 °C, iar pH-ul de 7,5 [15].

Pe mediile solide, coloniile izolate de stafilococi patogeni sunt de tip S, cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini regulate, suprafață netedă, bombată și lucioasă.

Mediul lichid prezintă turbiditate intensă și uniformă, cu aspect omogen și depozit granular în partea inferioară a eprubetei.

Aspectul cultural obișnuit poate fi modificat dacă este cazul unor tulpini stafilococice ce prezintă deficiențe ale peretelui celular, care, de exemplu, pot proveni din probe de lapte recoltate de la vaci supuse anterior antibioterapiei.

În asemenea cazuri, se pot forma, pe mediile solide, colonii de tip G (lucioase; *glossy = lucios*) pitice sau R (*rugose; rough = rugos*), mici, cu margini neregulate, granulate, nehemolitice. Aceste tulpini nu produc turbiditate în mediul lichid, ci doar un depozit granular în partea inferioară a tubului de cultură. Extrem de rar, se formează colonii de tip M, *mucoase* [15, 29].

Cu toate că nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemoliză și pigment, pe agar cu 5-8% sânge defibrinat de berbec sau de vițel, *S. aureus* produce, în general, o zonă circulară de hemoliză în jurul coloniei.

Producerea pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este observată

relativ constant la coloniile de *S. aureus*, dar și la stafilococii coagulază-negativi: *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*.

Producerea pigmentului la *S. aureus* poate fi întârziată timp de 24 - 48 h, în cazul în care tulpinile sub observație au fost supuse unor tratamente nefavorabile dezvoltării lor (antibiotic, antiseptic, termic), și nu se produce în anaerobioză.

Pigmentogeneza se poate stimula prin cultivarea probelor pe agar cu ser. În cazul stafilococilor coagulază-negativi, aspectul coloniilor variază cu vârsta coloniilor, însușirile lor (pigment, hemoliză) fiind clar definite după 72-120 ore de incubare la 37 °C [10, 19].

Dacă *S. aureus* este însămânțat pe mediul Baird-Parker, după 24 ore de incubare, se formează colonii cu diametrul de 1-1,5 mm, negre strălucitoare cu margine albă, îngustă, înconjurată de un halou clar cu diametrul de 2-5 mm. Alți stafilococi și micrococii formează colonii negre, fără halou clar [10, 19].

În practică, însă cu o valoare destul de aproximativă se examinează activitatea enzimatică față de manitol, ca indicator de patogenitate. Pentru realizarea acestui scop, datorită faptului că stafilococii sunt germeni halofili, se va utiliza un mediu selectiv hiperclorurat, respectiv mediul Chapman, care din culoarea roz obișnuită virează la culoarea galbenă, atunci când are loc fermentarea manitolului.

#### 2.1.4. Caracterile morfologice și tinctoriale

Stafilococii sunt bacterii cu formă sferică, coci, cu dimensiuni cuprinse între 0,8-1,0 micrometri, nesporulați, neciliați, necapsulați, care se divid în planuri succesive perpendiculare [6, 7, 28, 29, 31].

Așezarea neregulată a celulelor în grămezi de coci este determinată de incompleta separare a celulelor fiice de cele parentale, așezare asemănătoare boabelor din ciorchinele de strugure. Această așezare este caracteristică numai culturilor pe mediu solid. În frotiurile realizate din produse patologice și din culturi provenite din mediu lichid, cocii apar izolați câte 2—3 sau în grămezi mici, având dispoziție neregulată [6, 7, 28, 29, 31].

Frotiurile pot fi executate din produsul patologic ca atare (puroi, spută, exudat nasofaringian, secreții uretrale, secreții vaginale, secreții otice, secreții conjunctivale) sau după o prealabilă centrifugare, din sedimentul rezultat (lichid cefalorahidian, urină, lichide de puncție sau a diferitelor cavități, considerate a fi contaminate); efectuarea frotiului necesită 3 timpi:

- 1. Etalarea.** Produsul de examinat se așează pe o lamă degresată și curată, cu ajutorul unei anse sterile și apoi se efectuează etalarea uniformă pe o suprafață de aproximativ 2 cm<sup>2</sup> (pentru a obține o mai bună omogenitate și pentru a nu obține un preparat prea gros este indicată folosirea unei picături de ser fiziologic în care se omogenizează produsul patologic). În cazul în care frotiul trebuie realizat din fragmente de organe, se efectuează amprente prin atingerea lamei cu suprafața de secțiune a acestora.
- 2. Uscarea.** Este realizată la temperatura camerei sau la termostat.
- 3. Fixarea.** Se realizează cu ajutorul căldurii, lama cu frotiul în sus se trece de câteva ori, timp de 5-10 secunde, prin flacăra unui bec de gaz sau lampă cu alcool. Temperatura nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distruge structura bacteriană. Încălzirea este controlată prin simpla atingere a lamei de partea dorsală a mâinii, astfel, temperatura trebuind să fie suportabilă. Prin fixare preparatul aderă mai bine la lamă, iar microorganismele vor fi omorâte, eliminându-se astfel posibilitatea de contaminare și în același timp realizându-se creșterea afinității celulei bacteriene față de coloranți [7, 47].

Anumite tulpini de stafilococ pot realiza o capsulă mucopolizaharidică care poate fi vizualizată cu ajutorul microscopiei cu contrast de fază, contrast interferențial, microscopie electronică sau după colorație negativă cu tuș de China, prin microscopie optică. Tulpina ce a fost izolată de Smith este considerată a fi tulpină capsulată standard de stafilococ

patogen. Colorarea frotiurilor se poate executa în funcție de caz prin: *colorații simple* (folosind un singur colorant), *colorații diferențiale* (se vor utiliza mai mulți coloranți), *colorații speciale* (pentru evidențierea anumitor componente ale celulei bacteriene).

Pentru a se realiza identificarea microscopică a stafilococilor cele mai utilizate colorații utilizate sunt: colorația cu albastru de metilen și colorația Gram.

Dacă prima colorație ne dă informații asupra formei și așezării celulei bacteriene în frotiu, cea de-a doua colorație permite o diferențiere a bacteriilor Gram-pozitive de cele Gram-negative pe baza afinității tinctoriale [10, 15, 19].

Obișnuit, stafilococii se colorează Gram pozitiv, când celulele sunt tinere și cu potențialul metabolic intact. Celulele provenite din culturi vechi sau cele fagocitate de leucocite suferă modificări tinctoriale ca urmare a degradării structurilor peretelui bacterian putând astfel să apară negative prin colorația Gram [10, 15, 19].

### 2.1.5. Diagnosticul bacteriologic

#### Examenul direct

Se efectuează direct din produsele patologice, prin două tipuri de preparate:

- **între lamă și lamelă:** pentru aprecierea mobilității germenului, a prezenței sau absenței capsulei bacteriene;
- **pe frotiuri fixate și colorate:** Gram, albastru de metilen și May-Grunwald Giemsa.

Frotiurile efectuate direct din produsele patologice, colorate Gram, evidențiază coci Gram pozitivi sferici, așezați în grămezi (în ciorchine de strugure), nesporulați, uneori incapsulați, care, în cazul produselor normale contaminate, pot fi însoțiți de alți coci sau bacili (flora de asociație), polimorfonucleare (PMN) și celule epiteliale, întregi sau detritusuri.

Examenul direct între lamă și lamelă evidențiază germeni imobili. Colorațiile cu albastru de metilen și May-Grunwald Giemsa evidențiază aspectul citologic și relația dintre fagocite și germeni.

### 2.1.6. Identificarea minimală

Din punct de vedere al semnificației clinice a unui **stafilococ coagulază-negativ (SCM)**, ideea este susținută de izolarea acestuia în proporție predominantă sau în cultură pură și de izolările repetate ale acelorași tulpini din materialul patologic supus examinării.

Având în vedere scopurile și mijloacele de diagnostic ale unui laborator de analize medicale, este obligatoriu ca identificarea preliminară să vizeze evidențierea, cu un grad acceptabil de probabilitate, a speciilor mai frecvent implicate în patologia infecțioasă [40].

Dacă există rezistență la antibiotice, pentru monitorizarea tratamentului, în cazul unor infecții cronice, identificarea stafilococului coagulază-negativ (SCM) în unele laboratoare de bacteriologie poate fi de asemenea, necesară.

Aspectul microscopic, la fel și o serie de caractere fenotipice cum ar fi forma coloniilor pe medii neselective, alături de un set restrâns de teste enzimatică permit identificarea preliminară a speciilor mai frecvent izolate din infecțiile stafilococice.

În anul 1975, Sclifer și Kloos au realizat o schemă taxonomică a stafilococilor și au propus un sistem simplificat de identificare pentru uzul curent al laboratoarelor de bacteriologie. În acel sistem dihatomic erau utilizate 13 teste și permitea identificarea a 10 specii de stafilococi.

Cele 13 teste includeau: coagulaza, hemolizinele, reducerea nitraților și acidifierea a 10 zaharuri. Aceste teste cheie au fost interpretate în strânsă legătură cu creșterea anaerobă, sensibilitatea la lizostafin și sensibilitatea la novobiocină.

#### Activitatea hemolitică

Hemolizina este o exotoxină stafilococică cu structură proteică ce acționează asupra membranelor celulare, determinând liza elementelor sangvine și a celulelor din țesuturi [6, 7].

S-a identificat că stafilococii produc patru tipuri de hemolizine (alfa, beta, gamma și delta), care se deosebesc prin proprietăți

fizico-chimice, antigenice și prin tipul de hemoliză produsă. Prin cultivarea germenilor pe agar cu sânge (5-10%) sau prin punerea în contact a filtratelor din culturi cu o suspensie de hematii, procedeu care permite și titrarea hemolizinelor, se poate determina proprietatea de a secreta aceste exotoxine [6, 7, 10, 19, 28].

La *S.aureus* hemolizina  $\alpha$  poate determina hemoliză totală cu clarificarea completă a mediului.

Hemolizina  $\beta$  ce poate fi întâlnită la tulpinile animale de *S.aureus*, dar ocazional și la tulpinile umane, determină o așa numită hemoliză de tip „cald-rece” caracterizată prin zone de hemoliză incompletă la 37°C, care după expunerea culturii câteva ore la 4°C, devine completă, similară celei produse de hemolizina  $\alpha$  [6, 7].

### Fermentarea manitolului

Fermentarea manitolului este o proprietate foarte importantă dacă sunt luate în calcul tulpinile patogene. Pentru a se supune acestui test stafilococii vor fi cultivați pe mediul Chapman, mediu selectiv pentru izolarea stafilococilor patogeni, mediu special cu adaos de manitol și NaCl.

**Compoziție:** Extract de carne (I.C.) 4 g‰, peptonă (I.C.) 20 g‰, clorură de sodiu (p.a.) 75 g ‰, agar pulvis 19 g‰, D-Manită (p.a.) 10 g‰, roșu fenol (p.a.) 25 mg‰ dizolvate în apă la pH = 7,4 ± 0,2.

**Aspect:** produsul va fi un mediu solid de culoare roșie, roșie-cărămizie.

**Modul de lucru:** se va recurge la topirea mediului la baia de apă și la repartizarea în plăci Petri. Produsul pentru cercetat va fi însămânțat cu o ansă sau cu un tampon, astfel încât să se obțină colonii izolate.

Însămânțările pot fi realizate și cu ansa din mediul de îmbogățire (mediul hiperclorurat lichid). Se va incuba 18 - 24 ore la 37°C. Coloniile de stafilococi patogeni vor produce virarea mediului din roșu în galben. În cazul rezultatelor negative culoarea mediului rămâne neschimbată.

### Cultivarea pe mediul Chapman

Pentru stafilococi acest mediu este un mediu selectiv-diferențial.

Compoziție pentru 1000 ml; NaCl 75.0 g, agar 15.0 g, D-Mannitol 10.0 g, peptonă A 5.0 g, peptonă C 5.0 g, extract bovin 1.0 g, roșu fenol 0.025 g și un pH de 7.4 ± 0.2 la 25°C.

Mediul se folosește pentru izolarea selectivă și cultivarea stafilococilor. Microorganismele care utilizează manitolul transformă mediul în galben.

## 2.2. Identificarea primară

### 2.2.1. Testul oxidazei

Cu ajutorul testului pentru oxidază (indolfenoloxidază) se realizează diferențierea stafilococilor de interes medical (oxidază negativi) de unele genuri asemănătoare, respectiv *Micrococcus*, *Dermaococcus* etc, care sunt oxidază pozitive [7, 19].

Principiul care stă la baza acestui test îl reprezintă reacția prin care se oxidează tetrametil-p-fenilendiamina într-un component de culoare purpurie, sub acțiunea citocrom-oxidazei. Citocrom-oxidaza, cunoscută și sub numele de indol-fenoloxidază, este o hemoproteină din lanțul respirator de transport al electronilor cuplat cu fosforilarea oxidativă și, care, prin urmare, este absentă la bacteriile strict anaerobe. Cocii Gram-pozitivi se testează în cultura de 18-24 ore pe agar cu 7% sânge de berbec.

Culturile realizate pe alte medii (agar peptonă și extract de levură cu sau fără glucoză) pot fi testate abia după trei zile, iar reacția se pozitivizează într-un interval de 5-10 minute.

În cazul cocilor Gram-pozitivi este nevoie de 6 g de tetrametil-p-fenilendiamină dihidroclorică și 100 ml de dimetil-sulfoxid care se omogenizează pentru dizolvare.

Reactivul ce a fost astfel obținut, conservat la temperatura camerei și păstrat în locuri ferite de lumină rămâne activ timp de mai multe săptămâni [7, 19].

Cu ajutorul ansei bacteriologice se prelevează o porțiune de colonie și se dispersează cultura pentru a forma un spot pe un dreptunghi de hârtie de filtru, umectată cu reactivul pentru oxidază, plasat într-o placă Petri. Reacția se dezvoltă cu o soluție de 6% tetrametil-p-fenilendiamină în DMSO. Timp

de 2 minute se urmărește atent virajul spotului de cultură la albastru închis, ceea ce confirmă faptul ca testul este pozitiv, absența culorii indicând un test negativ. Controlul de calitate se realizează cu ajutorul unui martor pozitiv reprezentat de *Micrococcus luteus* și un martor negativ reprezentat de *Staphylococcus epidermidis* [7].

### 2.2.2. Testul catalazei

Testul cu ajutorul căruia se evidențiază activitatea catalazei ajută la diagnosticul diferențial față de alte specii de coci patogeni, în special, streptococi și pneumococi.

Stafilococii sunt catalază pozitivi, în timp ce streptococii și pneumococii nu posedă catalază.

Acest test se poate realiza prin tehnica rapidă pe lamă în care se depune o picătură dintr-o soluție 30% peroxid de hidrogen, apoi se prelevează o ansă bine încărcată din cultura de testat, pe geloză înclinată și se amestecă în picătura de peroxid.

Bulele de gaz ce apar imediat, indică prezența catalazei. Nu este indicată prelevarea coloniilor de pe mediul agar cu sânge, deoarece eritrocitele posedă catalază și falsifică reacția.

Este recomandată folosirea unei tulpini de enterococ și unei tulpini de stafilococ auriu ca martori negativi și pozitivi ai reacției, paralel cu tulpina de testat [19].

#### Teste pentru evidențierea coagulazei

Cu ajutorul acestui test se diferențiază cu succes stafilococii patogeni (coagulază pozitivi) de stafilococii nepatogeni (coagulază negativi).

Coagulaza este o enzimă extracelulară, produsă de majoritatea tulpinilor de stafilococ, ce determină coagularea plasmei.

Coagulazele stafilococice pot fi libere sau legate și au acțiune toxică (cea liberă acționează asemănător protrombinei, iar cea legată interacționează direct cu fibrinogenul) în urma căreia fibrinogenul este transformat în fibrină. Această acțiune se poate evidenția prin diferite metode în care suspensia de stafilococi este pusă în contact cu plasma. Testul pozitiv este indicat de apariția aglutinării (metoda pe

lamă) respectiv de coagularea amestecului (metoda în tub) [19].

Testul de latex-aglutinare pentru identificarea stafilococilor coagulază-pozitivi.

Este caracterizat a fi un test rapid de latex-aglutinare, care se realizează prin punerea în contact a culturilor bacteriene cu o suspensie specială ce conține anticorpi specifici. Apariția aglutinării după aproximativ 2 minute, indică un test pozitiv [19].

#### Testul coagulazei pe lamă

Această tehnică se bazează pe depunerea cu ansa bacteriologică a unei picături de plasmă pe o lamă, apoi se încarcă ansa cu cultură veche de 18-20 ore de pe geloză înclinată și se amestecă în picătură în plasmă. Acțiunea coagulazei se poate observa rapid prin apariția de mici coaguli care se îngrămădesc datorită precipitării fibrinogenului plasmatic în fibrină sub acțiunea enzimei.

Pe aceeași lamă se va realiza un martor cu apă fiziologică și cultură. Tehnica este fiabilă dacă se execută cu acuratețe, lama trebuie să fie nouă, bine spălată și degresată [19].

#### Testul coagulazei în tub

Pentru acest tip de test se utilizează 3 tuburi tip hemoliză curate, sterile în care se vor introduce câte 0,5 ml din plasma citratată de iepure diluată 1:5-1:10. În primul tub se adaugă 0,5 ml din cultura de stafilococ de cercetat veche de 18-20 ore în bulion, în cel de al doilea tub se adaugă 0,5 ml bulion, iar în cel de al 3-lea o tulpină de stafilococ despre care se știe sigur că este pozitivă.

Cele trei tuburi se vor incuba la 37°C într-o baie de apă. Citirea trebuie să se facă la interval de 30 minute, 1 oră, 2 ore, 3 ore și 24 ore pentru a stabili apariția coagulării.

Testul se consideră a fi pozitiv atunci când apare un coagul care plutește în amestec sau se realizează coagularea întregului amestec. Apariția coagulării se evidențiază prin înclinarea tubului și observarea acestuia cu ochiul liber. O coagulare care se realizează tardiv, la 24 ore este discutabilă, și testul trebuie refăcut după verificarea prealabilă a purității culturii. Tulpinile patogene de stafilococ elaborează coagulază în proporție

de 97% și de aceea acest test este considerat ca fiind de mare fiabilitate. Totuși s-a descris existența unor tulpini de stafilococ coagulazonegative care prezintă alți factori de patogenitate cu excepția coagulazei [19].

### Teste pentru evidențierea fosfatazei

Testul fosfatazei se folosește pentru a se putea diferenția speciile de stafilococ. *Staphylococcus aureus* prezintă în echipamentul său enzimatic fosfataza cu ajutorul căreia desface molecula de fosfat de fenolftaleină punând în libertate fenolftaleină. Prezența fenolftaleinei libere a putut fi evidențiată în mediu bazic. Se folosește agar nutritiv, la care se adaugă 0,01% fosfat de fenolftaleină [7, 19].

Placa cu agar nutritiv ce a fost împărțită în sectoare, va fi însămânțată, prin dispersia cu ansa, cu tulpinile de cercetat. În două sectoare se însămânțează două tulpini de control: una pozitivă (*S. aureus subsp. aureus*) și una negativă (*S. epidermidis* sau *S. saprophyticus*).

După realizarea însămânțării, cultura se va incuba 18-20 de ore la 37°C, apoi se va așeza în capacul cutiei Petri un disc de hârtie filtru îmbibată în amoniac. La interval de 1-2 minute se va putea observa colorarea în roz-roșu a coloniilor cu fosfatază pozitive. Coloniile ce nu posedă fosfatază rămân nemodificate [7, 19].

### 2.3. Diferențierea familiei, genului și speciilor de stafilococi

Pentru a se putea face diferențierea speciilor de stafilococi se recomandă respectarea unei scheme de diagnostic etapizat, prin realizarea unor teste multiple de diferențiere ale căror rezultate, coroborate, permit diferențierea speciilor de stafilococi [18].

Etapele cheie ale identificării stafilococilor:

1. Diferențierea fam. *Staphylococcaceae* de familia *Streptococcaceae* se face prin:

- aspectul microscopic;
- morfologia coloniilor;
- testul catalazei.

2. Diferențierea genului *Staphylococcus* de genul *Micrococcus* prin:

- testul producerii de acid din glucoză, în anaerobioză;
- testul sensibilității la lizostafin;
- testul producerii de acid din glucoză în aerobioză, în prezența eritromicinei (0,4μg/ml);
- testul sensibilității la furazolidon (100 μg / disc);
- testul modificat pentru oxidază;
- testul sensibilității la bacitracină (0,04 U / disc).

3. Diferențierea lui *S. aureus* de alte specii de stafilococi prin:

- caracterele de cultivare;
- testele coagulazei libere (în tub) și legate (pe lamă);
- testul proteinei A;
- testul termonucleazei;
- testul fermentării manitei în anaerobioză.

4. Diferențierea celorlalte specii de stafilococi.

Pentru realizarea testelor de identificare, se recomandă utilizarea de culturi microbiene ce s-au dezvoltat pe medii neselective: agar și bulion simplu sau cu adaos de sânge defibrinat de berbec 5-8%.

În cazul *SCN*, pentru identificarea precisă a agentului etiologic, se recomandă utilizarea unui inocul din una sau mai multe colonii, în vârstă de cel puțin 72 de ore.

### 2.4. Determinarea sensibilității la antibiotice

Pe suprafața unui mediu de cultură cu agar, preînsămânțat cu bacteria testată se depune o cantitate de substanță antimicrobiană și se poate observa producerea a două fenomene, concomitent: difuzarea antibioticului și creșterea bacteriei [4, 52].

Laboratoarele care testează un număr relativ mic de tulpini bacteriene cu creștere rapidă (inclusiv pentru testarea stafilococilor) folosesc foarte des metoda difuzimetrică pe cultură standardizată descrisă mai jos [4].

Pe plăci cu agar Mueller Hinton vor fi însămânțate probe provenite din culturile pure ale organismelor de testat. În plăcile cu agar Mueller Hinton se va turna într-un start uniform de aproximativ 4 mm grosime ceea ce corespunde cu o cantitate de 25 ml mediu per

placa ce are diametrul de 9 cm sau 60 ml per placa cu diametrul de 15 cm.

Se recomandă ca plăcile să fie utilizate în ziua în care au fost pregătite, iar, în cazul în care vor rămâne plăci neutilizate, acestea se vor împacheta în pungi de polietilenă și vor fi păstrate la 4°C maximum 7 zile.

Pentru controlul sterilității se incubează la 37°C timp de 24 ore o placă neînsămânțată care ulterior nu va mai fi utilizată.

**Modul de lucru.** Se va recurge la însămânțarea în tubul cu bulion nutritiv (2-4 ml bulion/tub) inoculul prelevat cu ansa din cca. 5 colonii bine individualizate, reprezentative pentru bacteria testată.

În continuare se va recurge la incubare la 37°C până ce turbiditatea culturii corespunde etalonului 0,5 Mc Farland (uzual 3-5 ore).

Din momentul etalonării plăcile pot fi inoculate în maxim 15 minute. Se va proceda identic și cu tulpinile de referință ce vor asigura controlul de calitate.

Plăcile vor fi însămânțate cu tamponul imersat și scurs de excesul de suspensie prin aplicarea unor striuri pe suprafața agarului Mueller Hinton în 3 direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60°, în final parcurgând cu tamponul și circumferința mediului la limita cu sticla [52].

După ce s-a realizat însămânțarea plăcilor cu agar Mueller Hinton, acestea se vor lăsa 3-5 minute în repaus pentru adsorbția inoculului.

Cu ajutorul unor pense sau a unor aparate de repartizare se vor depune discurile cu substanțe antimicrobiene la distanțe de minim 15 mm de marginea plăcii și 30 între centrele a două discuri învecinate.

Fiecare disc va fi presat ferm cu pensa după care plăcile vor fi incubate timp de 16-18 ore la 37°C.

Citirea și interpretarea rezultatelor se va realiza prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție complete și compararea rezultatelor obținute cu diametrele acceptate pentru zonele de inhibiție ale tulpinilor de referință.

În funcție de rezultatele obținute diametrele zonelor de inhibiție vor fi transformate în una din categoriile: *Rezistent*, *Intermediar*, *Sensibil* [52].

## 2.4.1. Rezistența la novobiocină și furazolidon

### Testul de sensibilitate la novobiocină

Este realizat pentru a se diferenția unele specii de stafilococi coagulază negativi față de speciile coagulază pozitive.

În acest mod, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. cohnii subsp. urealyticum* și *S. xylosus* sunt cunoscuți a fi stafilococi coagulază negativi, manită pozitivi, însă rezistenți la novobiocină, caracter fenotipic care îi diferențiază de stafilococii coagulază pozitivi și manită pozitivi.

Din multitudinea stafilococilor coagulază negativi, ce prezintă importanță medicală, numai *S. saprophyticus* este rezistent la novobiocină [10].

Se folosesc culturi tinere ce au fost crescute în bulion, plăci cu agar Mueller-Hinton și discuri cu 5 μg novobiocină.

Modul de lucru este asemănător antibiogramelor. Citirea și interpretarea se realizează în funcție de diametrul de inhibiție produs de discul cu novobiocină.

Astfel, în cazul tulpinilor rezistente, diametrul de inhibiție este ≤16 mm, iar în cazul culturilor sensibile este ≥16 mm [8, 10].

Prin **testul de sensibilitate la furazolidon** se pot diferenția stafilococii de micrococi. Acest test se bazează pe faptul că stafilococii sunt sensibili la compușii bacteriostatici din clasa furanilor, în timp ce micrococii sunt rezistenți.

Pentru realizarea acestei diferențieri, sunt necesare: cultură pură de 24 de ore în bulion, agar Mueller-Hinton și discuri cu 100 μg furazolidon, modul de lucru fiind asemănător antibiogramelor.

Astfel, tulpinile sensibile au o zonă de inhibiție cu **diametrul ≥ 15 mm**, iar cele rezistente o zonă de inhibiție cu **diametrul ≤ 10 mm** [8].

## 2.5. Mediile cromogene

În ultimii 20 de ani, au fost inventate medii de cultură cromogene, cu ajutorul cărora se poate diferenția unele bacterii patogene față de bacterii nepatogene. În aceste medii sunt înglobate diferite substraturi chimice ce pot fi hidrolizate de enzimele bacteriene, punând

astfel în libertate substanțe care colorează coloniile formate pe mediile solide, iar pe baza culorii rezultate se pot diferenția speciile bacteriene patogene de cele comensale.

În anumite situații, bacteriile comensale pot fi inhibitate complet, de agenții chimici selectivi, permițând, astfel, bacteriilor patogene să "iasă în evidență", respectiv să crească și să formeze colonii caracteristice.

Mediile cromogene sunt folosite, în principal, pentru diagnosticul bacteriologic de rutină, având ca scop reducerea timpului și a consumabilelor utilizate în metodologia clasică a examenului bacteriologic [11, 21, 32].

Dacă se aduc în discuție examenele bacteriologice efectuate pentru izolarea și tipizarea stafilococilor de la animale și oameni la care s-au utilizat medii cromogene, obiectivele urmăresc două aspecte:

- pentru identificarea tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus* rezistente la metilicilină (*S. aureus* methicilline resistant - MRSA)
- diferențierea lui *S. aureus subsp. aureus* de stafilococii coagulază negativi [23].

Mediile cromogene folosite intens pentru diferențierea lui *S. aureus subsp. aureus* sunt:

- *Chromatic Staph Aureus*;
- *S. aureus ID*
- *CHROMagar™ Staph aureus* [23].

Mediile cromogene utilizate pentru diferențierea tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus* metilicilin rezistente sunt reprezentate de: *Chromatic MRSA*, *BBL CHROMagar™ MRSA*, *MRSA Select*, *ChromID MRSA*, *Oxoid MRSA Chromogenic medium*, *MRSA Screen*, *Brilliance™ MRSA 2 Agar* [17, 23, 25, 26].

## 2.6. Sistemele comerciale

Multe companii care produc consumabile destinate examenelor bacteriologice, expun pe piață truse de identificare și / sau instrumente automatizate care identifică speciile de stafilococi cu o precizie cuprinsă între 70-90% [10].

Astfel, cu precădere în medicina umană, dar mai nou și în cea veterinară, se poate apela la o gamă variată de microteste pentru diagnosticul bacteriologic al infecțiilor

stafilococice, însă acestea cresc costul identificării, din care cauză utilizarea lor nu este întotdeauna disponibilă [10].

### 2.6.1. Identificarea cu sistemul API Staph

Prin utilizarea microtestului *API Staph (bioMérieux SA, Franța)* și a programului software *Apiweb™* se pot identifica la nivel de specie atât stafilococii catalază pozitivi, cât și cei catalază negativi [21, 27, 53].

*Principiul metodei:* Sistemul *API Staph* este caracterizat a fi un sistem standardizat de recunoaștere a genurilor *Staphylococcus*, *Micrococcus* și *Kocuria*, care conține folii cu 20 de microtuburi cu diferite substraturi deshidratate.

În aceste microtuburi se depozitează o suspensie bacteriană, preparată în *API Staph Medium*, urmând ca folia să fie introdusă la termostat timp de 18-24 ore, la  $36 \pm 2^\circ\text{C}$ , perioadă de-a lungul căreia, din cauza metabolismului bacterian, se produc modificări tinctoriale, care fie sunt spontane, fie sunt relevate cu reagenții adiționali ai sistemului *API Staph*.

La sfârșitul perioadei de incubare, reacțiile enzimatică sunt citite cu ajutorul unui tabel de identificare sau al unui program software, asigurat de firma *bioMérieux SA*, bacteriile din cultura de cercetat fiind, astfel, încadrate taxonomic într-unul din genurile mai sus menționate [20, 53].

Interpretarea și citirea rezultatelor testului necesită mai multe etape, bine evidențiate, în prospectul producătorului, prin completarea unei fișe preexistente, obținându-se în acest mod un cod numeric care va fi interpretat cu ajutorul programului *Apiweb™* sau se vor citi reacțiile prin raportare la un tabel de citire și un tabel de identificare [27, 53].

### 2.6.2. Identificarea cu sistemul Vitek 2 Compact

*Vitek 2 compact* reprezintă un sistem automat prin intermediul căruia se identifică și se testează sensibilitatea la antibiotice a bacteriilor, utilizând carduri disponibile sistemului pentru identificarea bacteriilor și a fungilor, totodată și pentru testarea

sensibilității la antibiotice a bacteriilor identificate [46, 49].

Cardurile colorimetrice de identificare cu ajutorul cărora funcționează sistemul conțin 64 de microcelule, în interiorul cărora se găsește substratul biochimic specific deshidratat [49].

1. Echipamentul Vitek 2, ce este folosit pentru verificarea rezistenței la substanțele antimicrobiene, prezintă un sistem de analiză, denumit "*Advanced Expert System (AES)*", capabil să recunoască și să clasifice tulpinile

testate după anumite tipare de sensibilitate la substanțele antibacteriene care identifică un fenotip specific și, care, ulterior este interpretat.

Metode utilizate pentru testare se bazează pe tehnica concentrației minime inhibante, prin metoda diluțiilor.

În fiecare celulă din card, în afară de agenți microbieni specifici mai există și mediu de cultură, iar condițiile de creștere sunt microaerofile.

**Tabelul 1**

Sisteme de microteste utilizate pentru identificarea stafilococilor [55].

| Denumire comerciala                                      | Număr bioteste | Citire la | Producător                                       | Observații   |
|--|----------------|-----------|--|--|
| API STAPH IDENT System                                   | 10             | 5 h       | Analytab products                                |  |
| API 20 GP System   | 20             | 24 h      | Bio – Merieux Vitek                              | Citire automată  |
| API 20 STAPH System                                      | 20             | 24 h      | Montalieu Vercieux                               |  |
| API STAPH Trac System                                    | 20             | 24 h      | Plainview N.Y.                                   | Citire automată  |
| DMS STAPH Trac System                                    | 20             | 24 h      | DMS Lab. Flemington                              | Citire automată  |
| ID 32 STAPH System                                       | 3              | 24 h      | Bio – Merieux Vitek                              | Citire vizuală sau automată  |
| Auto Microbic System (Gram Positive Identification Card) | 27             | 24 h      | Vitek System Hazelwood                           | Automatizat  |
| Micro Scan Pos ID Panel                                  | 27             | 24 h      | Baxter Diagnostic Sacramento                     | Citire automată sau vizuală  |
| Micro Scan Rapid Pos ID Panel                            | 42             | 24 h      | Baxter Diagnostic Sacramento                     | Citire automată  |
| Pos Combo Type 6 Panel                                   |                | 24 h      | Baxter Diagnostic Sacramento                     | Citire automată + antibiogramă   |
| Rapid Pos Combo Type 1 Panel                             |                | 5 h       | Baxter Diagnostic Sacramento                     | Citire automată + antibiogramă   |
| Minitek Gram Positive Set                                | 21             | 18 h      | Becton Dickinson Instrument System, Cockeysville |  |
| Sceptor Staphylococcus MIC/ID Panel                      |                | 24 h      | Becton Dickinson Instrument System, Towson       | Citire automată + antibiogramă   |
| Sceptor Gram Positive Break Point / ID Panel             |                | 24 h      | Becton Dickinson Instrument System, Towson       | Citire automată + antibiogramă   |
| GP Micro Plate test Panel                                | 95             | 24 h      | Biolog, Haywood                                  | Citire vizuală (software Biolog), Citire automată (Biolog Micro Station) |
| Microbial Identification System (MIS)                    |                |           | MIDI, Newark, del.                               | Citire automată, combină analiza acizilor grași cu gaz cromatografia     |

Schimbările ce se produc în creșterea și metabolizarea bacteriilor, de-a lungul incubării, determină schimbări de transmitanță care sunt înregistrate de aparat la fiecare 15 minute.

Cu ajutorul măsurătorilor se poate realiza o curbă de creștere pentru fiecare celulă în parte, iar ca urmare a analizei algoritmice se obține un profil biochimic al speciei testate.

Rezultatele obținute sunt comparate cu datele stocate în baza de date a aparatului [45, 46, 49].

2. În vederea testării sensibilității la antibiotice sunt utilizate carduri care conțin diluții variate de agenți antimicrobieni specifici, iar valorile concentrației minime inhibante sunt determinate pentru fiecare antibiotic din card.

La fiecare 15 minute, programul calculatorului realizează citirea cardurilor.

Măsurătorile determină obținerea unei curbe de creștere pentru fiecare concentrație de antibiotic în parte [49].

3. Rezultatele obținute se compară cu cele din metoda de referință care sunt stocate în soft-ul de analiză a aparatului [45, 49].

### 3. Teste de biologie moleculară

#### 3.1. Reacția polimerizică în lanț

Există numeroase studii care descriu folosirea reacției de polimerizare în lanț (PCR) pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor de *S. aureus*.

PCR se traduce prin amplificarea exponențială a unei regiuni de interes medical din genomul bacterian.

Reacția decurge după modelul replicării naturale a ADN [2, 13, 16, 43, 44].

Pentru a se realiza creșterea sensibilității, majoritatea metodelor utilizează amplificarea regiunilor conservate ale genelor ARNr-ului bacterian și necesită etape suplimentare, ca de exemplu hibridizarea cu sonde specie-specifice.

Alte protocoale vizează detectarea *S. aureus* prin amplificarea genelor întâlnite numai la această specie (gena *nuc*, pentru endonucleaza termostabilă, gena *coa*, pentru coagulază, un fragment nedefinit de 442 perechi de baze al cromozomului *S. aureus* gena *clfA*, pentru proteina de legare a fibrinogenului etc.) [51].

Data fiind importanța detectării rezistenței la metilicilină (oxacilină), anumite metode utilizate se concentrează direct pe amplificarea genei *mec A*, fie singură, fie în PCR multiplex, cu amplificarea simultană a unor markeri adiționali [2].

Real Time PCR IDI-MRSA a fost elaborat și difuzat de către CLSI (Institutul pentru Standarde de Laborator Clinic, fostul NCCLS), test validat de Food and Drug Administration, pentru controlul infecțiilor nosocomiale [51].

Pentru diferențierea tulpinilor de *S. aureus* în scop epidemiologic, de-a lungul timpului au fost dezvoltate alte categorii de metode.

Cu ajutorul acestor metode este posibilă diferențierea tulpinilor circulante, dar totodată se oferă și posibilitatea diferențierii tulpinilor epidemice de cele neepidemice, precum și a celor de proveniență spitalicească de cele comunitare [13].

Într-o primă fază a fost abordată compararea pattern-urilor de restricție endonucleazică ale ADN cromozomial sau plasmidic. Multe tehnici de generația a doua au inclus hibridizarea pe suport solid folosind sonde specifice, ribotipia, polimerizarea în lanț (PCR-RFLP) și PFGE (electroforeza în câmp pulsatil) [2].

Metodele de ultimă generație realizează analiza mutațiilor situs-specifice ale secvențelor ADN, iar rezultatele sunt utilizate pentru intercompararea tulpinilor de *S. aureus* [16].

Programul satelit al Sistemului European de Supraveghere a Rezistenței la Antibiotice (EARSS), SeqEU-Net, în care participă și Laboratoarele de Referință din România, abordează armonizarea metodologiei de tipare a *S. aureus* prin secvențierea genei *spa* (pentru proteina A) [2, 13, 16].

#### 3.2. Hibridizarea

Hibridizarea este o metodă care utilizează capacitatea acizilor nucleici de a disocia, în momentul în care sunt supuși unor condiții de stres (factor termic, stringență ionică) și de a reasocia, atunci când condițiile de denaturare au fost eliminate.

Denaturarea se traduce prin ruperea legăturilor de H între bazele azonate ale celor două lanțuri de ADN și prin urmare prezentarea ADN-ului sub formă monocatenară (single ADN-ssADN). După ce se produce reasocierea cu lanțul pereche va rezulta un duplex omolog, în timp ce dacă reasocierea se realizează prin complementaritate cu un lanț ARN sau ADN heterolog se obține un duplex hibrid (hibridizare).

Prin studiul hibridizilor se obțin informații cu privire la gradul de similitudine între moleculele de ADN extrase din celule diferite și reprezintă baza științifică a taxonomiei moleculare.

Pentru identificarea speciei *S.aureus* se utilizează hibridizarea pe suport solid cu sonde specie-specifice.

### 3.3. Alte metode

Alte metode ce pot fi utilizate în identificarea stafilococilor sunt:

- metode bazate pe studiul acizilor nucleici (altele decât PCR): izolarea și purificarea acizilor nucleici, transformarea genetică, clonarea, electroforeza în gel de agaroză, secvențierea, ribotipia etc.
- testul imunoenzimatic ELISA.

### 3.4. Identificarea definitivă

#### 3.4.1. Fermentarea zaharurilor

În scopul punerii în evidență a activității față de glucide și polialcoolii, bacteriile se cultivă pe medii solide sau lichide, la care se adaugă substanțele respective, în proporție de 0,5-1%, și un indicator de reacție a mediului [10, 29].

Cele mai utilizate substanțe sunt următoarele: glucoza, lactoza, zaharoza, galactoza, manoza, sorbitolul, trehaloza, arahinoza, maltoza și manitolul, adăugate în apa peptonată, care se alcalinizează și se încălzește 15 minute la 115°C, apoi se filtrează și se sterilizează 20 minute la 112-115°C [29].

În mediul ce a fost preparat cum s-a relatat mai sus, se adaugă, doar în condiții sterile, soluțiile de monoglucide, care au fost preparate în prealabil. Aceste substanțe pot fi adăugate și înainte de sterilizarea apei peptonate, în acest caz, însă, mediul se sterilizează prin tindalizare [29].

Soluția de albastru de bromtimol este utilizată ca și indicator, adăugându-se după dezvoltarea bacteriilor, în momentul citirii rezultatului, introducând în cultură 2-3 picături [29].

### 4. Identificarea clonală

În vederea prevenirii și controlului infecțiilor produse de stafilococi atât la oameni cât și animale este indispensabilă cunoașterea

surselor și a căilor de transmitere a acestor bacterii, având în vedere riscul zoonotic pronunțat pe care îl prezintă unele specii de stafilococ.

Date fiind aceste motive, se impune o identificare rapidă a acestora, bazată pe evidențierea unor markeri clonali de interes epidemiologic. Identificarea clonală cuprinde în mod curent antibiotipia și lizotipia [10].

#### 4.1. Antibiotipia

Antibiotipia este o metodă de identificare a fenotipurilor de rezistență, la stafilococi, realizată în scopul stabilirii circuitului epidemiologic al tulpinilor multiplu rezistente, în special, a tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus* rezistente la meticilină, tulpini caracterizate de un risc zoonotic pronunțat.

La baza acestei metode stă testarea sensibilității față de antibiotice după metodologia disc-difuzimetrică [1].

Antibiograma (testarea sensibilității unei tulpini bacteriene la agenți antimicrobieni) reprezintă una din ce le mai dese examinări solicitate, în primul rând, din motive clinicoterapeutice, dar efectuată și în alte scopuri, ca investigație epidemiologică, cercetare etc. [33].

##### 1. Principiul antibiogrammei difuzimetrice:

Prin așezarea biodiscurilor cu antibiotice pe suprafața unui mediu de cultură agarizat, pe care s-a însămânțat în prealabil bacteria supusă testării, substanța antimicrobiană activă va difuza în mediu prezentând o scădere constantă a gradientului de concentrație, de la marginea discului către periferie [11, 33].

După incubație (caracterizată ca și perioadă critică), 24 ore în cazul stafilococilor, se vor observa două zone distincte, respectiv una în care creșterea bacteriană este inhibată de concentrația de substanță antimicrobiană și o zonă de creștere, în care concentrația de antibiotic este prea mică pentru a inhiba creșterea.

Cu cât diametrul zonei de inhibiție este mai mare, cu atât germeul este mai sensibil, respectiv cantitatea de antibiotic necesară inhibiției germeului (concentrația minimă

inhibantă = CMI) este mai mică și invers, astfel că, diametrul zonei de inhibiție variază invers proporțional cu CMI [11, 33].

Tulpina bacteriană testată este clasificată în categorii de sensibilitate, respectiv *sensibilă*, *intermediară* sau *rezistentă*.

Diametrele critice au o valoare, orientativă statistic, valabilă, dar nu reprezintă criterii absolute universal acceptabile în clinică. Orice abatere de la respectarea cu extremă scrupulozitate a indicațiilor date pentru tehnica Kirby-Bauer vor compromite rezultatele [11, 33].

Metoda Kirby-Bauer este o metodă uzuală pentru laboratoarele care testează, un număr relativ mic de tulpini bacteriene, cu creștere rapidă (creștere peste noapte la 35-37°C) și fără diferențe semnificative, de la tulpină la tulpină, a ratei de creștere (stafilococi, streptococi, enterococi etc).

Mediul de cultură este agarul Mueller-Hinton pe considerentul că are o valoare nutritivă care permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de germeni și nu conține inhibitori ai acțiunii unor substanțe antimicrobiene. Acesta se toarnă în plăci în strat uniform de 4 mm grosime: 25 ml mediu per placă cu diametrul de 9 cm sau 60 ml per placă cu diametrul de 15 cm [11, 33].

Este absolut necesar ca inoculul din tulpina de cercetat să fie reprezentativ, adică să cuprindă toate categoriile populației microbiene, din punct de vedere al rezistenței.

Asfel, pentru prepararea inoculului, se va pleca în mod obligatoriu de la 4-6 colonii identice dezvoltate pe un mediu neselectiv [33].

**Citirea și interpretarea** rezultatelor se bazează pe măsurarea diametrului zonelor de inhibiție completă, iar valorile ce au fost obținute vor fi raportate la un tabel interpretativ cu fiecare substanță antimicrobiană pentru a le transforma în categorii de sensibilitate, respectiv sensibil, intermediar sau rezistent [11].

La stafilococii patogeni incriminați în etiopatogeneza unor infecții la animale și la oameni au fost descoperite mai multe fenotipuri de rezistență față de:

- macrolide cu 14 atomi;

- macrolide cu 16 atomi;
- tetraciclone;
- cloranfenicoli;
- penicilinele clasice (fenotipul clasic, fenotipul inactivator prin  $\beta$ -lactamază și fenotipul MRSA);
- aminoglicozide;
- quinolone (1, 11).

## 4.2. Lizotipia

Foarte multe tulpini de stafilococi sunt lizogene, respectiv purtătoare de bacteriofagi integrați în cromozomul celular ca gene suplimentare ce se pot transmite filogenetic la celulele fiice asigurând perpetuarea fagilor stafilococi în natură.

Celulele în a căror compoziție există fagi, nu sunt afectate de acțiunea lor litică, dar aceasta se poate manifesta în anumite condiții față de stafilococii aparținând altor specii denumite lizosensibile [19].

Baza sistemului este reprezentată de stabilirea pattern-ului (modelului) de lizosensibilitate ce este manifestat de o tulpină de stafilococ patogen, de proveniența umană, la mai mulți bacteriofagi antistafilococi.

Pattern-urile (modelele) de lizosensibilitate, ale tulpinilor stafilococ patogen de proveniență umană, au putut fi grupate în lizotipuri care cuprind majoritatea tulpinilor patogene izolate de la oameni și mai puțin de la animale, iar cele care nu au putut fi încadrate, în grupurile fagice, au fost considerate grup suplimentar [12, 19].

Tipajul fagic se face cu ajutorul mai multor seturi de fagi, dintre care la noi în țară, în Institutul "Dr. I. Cantacuzino", se utilizează următoarele:

### a. fagi umani din setul internațional de bază:

- grupa I: 29, 52 A, 72, 80;
- grupa II: 3 A, 3 C, 55, 71;
- grupa III: 6, 42 E, 47, 53, 54, 75, 77, 83 A, 84, 85;

### b. fagi umani din setul adițional:

- 42 B, 47 C, 52 B, 69, 73, 78;
- fagi umani din setul experimental:
- 81, 94, 95, 96, 88, 89, 90, NK<sub>2</sub>, D<sub>11</sub>;

### c. fagi din setul bovin al lui Davidson:

- 116, 117, 118, 119 [29].

Lizotipia stabilește sursa de infecție și filiera epidemiologică, respective circuitul epidemiologic al unor tulpini de stafilococi, mai ales, în cazul focarelor de toxiinfecții alimentare și a infecțiilor nosocomiale [29].

Baza metodei este reprezentată de stabilirea grupului fagic, la care o tulpină este sensibilă, sau lizotipului tulpinii de stafilococ patogen izolate cu ajutorul unui set de bacteriofagi activi asupra tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus* de origine umană [19].

## 5. Detectarea toxinogenezei

Toxinele stafilococice denumite și *factori toxici* reprezintă factori de patogenitate care acționează direct asupra unor celule sau țesuturi, producând tulburări morfologice sau funcționale.

Aceste toxine sunt produse de stafilococii patogeni, fiind eliminate extracelular, respectiv în țesuturi [19, 29, 48].

Toxinele stafilococice au structură proteică și sunt puternic antigenice, stimulând formarea anticorpilor antitoxici neutralizanți.

Prin aceste caracteristici pot fi considerate ca factori majori ai patogenității tulpinilor de stafilococ.

Principalele toxine stafilococice sunt: hemolizinele, leucocidinele, enterotoxinele și toxina epidermolitică și exfoliantă [32, 48].

Unele tulpini de stafilococ coagulazopozitive prezintă capacitatea de a sintetiza molecule toxice cu proprietăți de exotoxine difuzibile și cu tropism pentru mucoasa intestinală.

Studii recente au demonstrat că și unele tulpini coagulazo-negative produc enterotoxine. Aceste molecule toxice au o structură proteică simplă cu greutate moleculară de 26.000-35.000 de daftoni și o structură antigenică variată.

Bergdoll și Calman, prin studiile lor asupra structurii antigenice a enterotoxinei au permis delimitarea a 6 variante antigenice, notate A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D și E care pot fi identificate prin imunodifuzie în gel cu antiseruri specifice [5, 19]. Informația genetică pentru sinteza de

enterotoxină poate fi cromozomială sau plasmidică. S-a demonstrat că enterotoxinele reprezintă una din cauzele cele mai frecvente ale sindromului de toxiinfecție alimentară și totodată au fost implicate și în enterocolitele pseudo-membranoase post antibiotice.

În cazurile de toxiinfecție alimentară cu stafilococ, cele mai frecvent întâlnite sunt enterotoxinele A și D.

Enterotoxina B a fost declarată ca fiind cauza pentru enterocolitele post tratament cu antibiotice, în urma descoperirii unei asociații între rezistența la metilicină și sinteza de enterotoxină B la tulpinile izolate din intestinul bolnavilor cu enterocolită post antibiotică [5, 19, 32].

Enterotoxinele stafilococice sunt relativ termostabile, comparativ cu alte exotoxine bacteriene, rezistând aproximativ 1 oră la 100°C, astfel că ele nu pot fi degradate în cursul preparării alimentelor.

Termostabilitatea permite separarea lor cu ușurință față de celelalte toxine și enzime extracelulare stafilococice prin încălzire la 80°C, timp de 30 minute a filtratului de cultură [19].

Moleculele de enterotoxine prezintă o rezistență marcată față de unele enzime proteolitice cum ar fi tripsina, papaina și chemotripsina, precum și la variații de pH [19].

Enterotoxinele stafilococice produc frecvent toxiinfecții alimentare, la oameni, prin mecanisme de acțiune foarte complexe, identificate prin observații clinice și experimentale [5, 32].

**Hemolizinele stafilococice** sunt molecule toxice stafilococice, ele fiind mai intens studiate cu ajutorul experimentelor, molecule ce exercită o activitate biologică variată, reprezentată în principal de acțiunile: hemolitică, letală și dermonecrotică.

Acestea sunt distincte antigenic, fiind denumite: *alfa*, *beta*, *gamma* și *delta* hemolizine, având o distribuție heterogenă la speciile de stafilococi [19, 29].

**Leucocidina** prezintă o acțiune exclusivă și selectivă asupra neutrofilelor și macrofagelor de iepure și om.

Structura moleculei de leucocidina este complexă, fiind reprezentată de 2 subunități

proteice distincte electroforetic, una termolabilă și una termostabilă.

Cele 2 bucăți separate sunt inactive biologic, dar prin intermediul acțiunii sinergice exercită asupra neutrofilelor o activitate de degranulare (distrugerea membranei lizozomale) și o acțiune de degradare asupra membranei leucocitelor neutrofile care se umflă și se deformează.

Sub tensiunea acestor două acțiuni ale leucocidinei, membrana leucocitului cedează și celula este distrusă. Activitatea leucocidinei depinde foarte mult de prezența ionilor de calciu care-i mărește acțiunea.

Ambele componente ale moleculei de leucocidina sunt puternic antigenice și activitatea biologică a leucocidinei este neutralizată de anticorpii corespunzători [5, 19].

Leucocidinele sunt de trei tipuri, însă două au fost asimilate cu *hemolizinele  $\alpha$  și  $\delta$* , iar a treia denumită și leucolizină este nehemolitică, fiind considerată un factor accesoriu de patogenitate al stafilococilor față de neutrofilele organismului gazdă [5].

#### *Toxina epidermolitică și exfoliantă.*

Unii stafilococi patogeni aparținând mai frecvent grupului II bacteriofagic prezintă un tropism marcant pentru țesutul cutanat provocând variate infecții la nivelul tegumentelor.

Molecula toxică stafilococică responsabilă pentru aceste manifestări, cunoscută sub denumirea de toxină epidermolitică exfoliativă sau epidermolizina a putut fi decelată și studiată experimental pe șoareci nou născuți la care se poate reproduce sindromul generalizat de epidermoliză-exfoliere [19].

### 5.1. Metode de detecție

Identificarea enterotoxinelor stafilococice prin inoculări la animale (bioproba) poate fi realizată pe maimuță și pe pisoi [5].

**Bioproba pe primat non-umane** din speciile *M. rhesus* și, în special, *M. mulatta*, animale care s-au arătat a fi cele mai sensibile față de enterotoxinele stafilococice, acestea fiind cei mai vechi detectori de toxine și

mijloace prețioase de diagnostic. Manipularea dificilă și întreținerea costisitoare a acestor animale nu permit a fi utilizate pentru diagnostic în probele de rutină. De multe ori, ele devin rezistente față de enterotoxine după o primă inoculare și, deci, folosirea lor este limitată [5].

**Bioproba pe pisoi**, inaugurată de Dolman, Wilson și Cockcroft în 1936, este cunoscută și sub denumirea de **Testul Dolman**.

Pisoi cu vârstă cuprinsă între 6 săptămâni și 3 luni prezintă sensibilitatea cea mai mare și pot deveni rezistenți la 10-14 zile după o primă inoculare, de aceea, ei pot fi folosiți la bioprobe repetate numai în cadrul acestei perioade [4].

În vederea detectării enterotoxinelor prin **teste imunologice** este nevoie de extracția și purificarea lor din materialele de cercetat (5).

*Reacția de imunoprecipitare prin imunodifuzie în gel* a reprezentat multă vreme unicul mijloc cu ajutorul căruia se putea pune în evidență enterotoxinele stafilococice "in vitro". Având în vedere sensibilitatea sa, relativ mică, dar pentru a putea fi totuși folosită s-a recurs la concentrarea enterotoxinei purificate, extrase din supernatantul culturilor. Există trei tehnici după care se poate executa reacția de seroprecipitare [5].

*Testul imunoenzimatic (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA)* prezintă o sensibilitate foarte mare, fiind capabil să deceleze cantități mai mici de 1 ng/g (ml).

De asemenea, este deosebit de specific, consumând foarte puțin timp, e foarte rapid și operativ, iar rezultatul lui poate fi aflat în 90-120 de minute.

Testul ELISA pe lângă detectare, permite și determinarea cantităților de enterotoxină A din substraturile examinate [5].

#### **Reacțiile de aglutinare.**

Reacția de hemaglutinare pasivă inversă și latex aglutinarea pasivă inversă au fost utilizate pentru detectarea enterotoxinelor stafilococice, reacții care folosesc particule de latex sensibilizate cu imunoglobuline anti-enterotoxine, care aglutinează în prezența enterotoxinelor stafilococice omoloage [5].

## 6. Teste de biologie moleculară

Cercetarea genotipului, a organizărilor genetice în general, înfățișează unul dintre principalele obiective ale biologiei moleculare și, în același timp, un instrument esențial al biotehnologiilor moderne.

În vederea realizării acestui scop, au fost create metode prin aplicarea cărora sunt decelați și caracterizați acizii nucleici, permițând, totodată, evitarea analizelor fenotipice care conferă date cu privire la produsele de expresie a genelor și la efectele lor biologice, respectiv morfologice și funcționale [13, 43, 44].

În funcție de apartenența genomului care este caracterizat în scop de diagnostic, tehnicile de investigație genetică, la nivel molecular, pot fi diferențiate :

- celule din cadrul sistemelor biologice ale organismului afectat de o anumită boală cu determinare genetică (om, animale);
- agenți etiologici, în principal bacterii și virusuri [44].

Localizarea și caracterizarea genelor implicate în etiologia multor boli au devenit posibile prin aplicarea tehnicilor genetice moleculare [13, 44].

Atât pentru medicina veterinară, cât și pentru cea umană, o importanță deosebită este reprezentată de aplicarea acestor metode pentru detectarea agenților etiologici animați, deci pentru diagnosticul bolilor bacteriene, virale, micotice și parazitare [2, 13, 43].

Principalele metode aplicate în scopul analizării genotipului sunt reprezentate de:

- **transformarea genetică**  
este caracterizată ca fiind modificarea proprietăților unei celule bacteriene ca urmare a achiziției, în mod dirijat, a unui fragment de ADN exogen;
- **amplificarea genică**  
redă creșterea numărului de copii ale unor fragmente de acizi nucleici luați în studiu, fiind reprezentată prin intermediul următoarelor tehnici:
  - *clonarea*;
  - *electroforeza în gel de agar*;
  - *reacția polimerazică în lanț (polymerase chain reaction - PCR)*;

- **hibridizarea moleculară**

- *hibridizare în soluție*;
- *hibridizare pe membrană*;

- **secvențierea**

cu ajutorul acesteia se determină ordinea nucleotidelor în lanțul de acid nucleic, fiind utilizată ca:

- *pyrosecvențiere*;
- *secvențiere automată*;

- **microchips (microarray)(expresia genică)** presupune transcrierea informației din ADN în ARN mesager plus traducerea acestei informații în proteine cu rol structural sau funcțional;

- **profilul plasmidic**

reprezintă o metodă folosită în studierea clonalității tulpinilor bacteriene care generează fenomene epidemiologice, fiind efectuată sub forma:

- *profilului de restricție enzimatică a ADN-ului plasmidic*;

- **metoda de analiză a fragmentelor de restricție**

se poate efectua sub două forme:

- *ribotipia, definită ca profilul de restricție a genelor responsabile de sinteza ARN-ului ribozomal*;
- *profilul de macrorestricție în câmp pulsator* – reprezintă o metodă standard a epidemiologiei moleculare [43, 44].

Metodele moleculare pot fi utilizate pentru:

- detectarea rapidă a *S.aureus* și a stafilococilor coagulază-negativi, în combinație cu identificarea genelor de rezistență la antibiotice (*mecA* cu sau fără alte gene de rezistență);
- detectarea rapidă a stafilococilor în probele prelevate;
- detectarea genelor care codifică factorii de patogenitate;
- identificarea tulpinilor de stafilococi;
- tipizarea tulpinilor de stafilococi în scop epidemiologic.

## Bibliografie

1. Aarestrup F.M., Schwarz S. (2006) – *Antimicrobial resistance in staphylococci and streptococci of animal origin, în Antimicrobial*

- resistance in bacteria of animal origin*, Ed. ASM Press, Washington, D.C., 187-212;
2. **Aarts H.J. M., Guerra Beatriz, Malorny B. (2006)** – *Molecular methods for detection of antibiotic resistance*, în *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, Ed. ASM Press, Washington, D.C., 37-48;
  3. **Authier, S., Paquette D., Labrecque O., Messier S. (2006)** - Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *Can. Vet. J.* 47, 774-778.
  4. **Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, et al. (2004)** - Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis.* 189(9):1565-1573
  5. **Bârzoi D., Meica S., Neaguț M. (1999)** – *Toxiinfecțiile alimentare*, Ed. Diacon Coresi, București
  6. **Bîlbie, V., Pozggi, N. (1985)** - *Bacteriologie medicală*, Volumul II, Editura Medicală, București.
  7. **BUIUC D., (2008)** – *Izolarea bacteriilor și studiul culturilor*, în *Tratat de microbiologie clinică*, ediția a II-a, sub redacția BUIUC D., NEGUȚ M., Ed. Medicală, București, 98-116.
  8. **Buiuc D., Zamfirescu M. (2008)** – *Teste de identificare a microorganismelor*, în *Tratat de microbiologie clinică*, ediția a II-a, sub redacția Buiuc D., Neaguț M., Ed. Medicală, București, 1101-1188;
  9. **Cătana N. (2001)** - *Infecții produse de germeni din genul Staphylococcus*, în *Boli Infecțioase ale animalelor*, Bacterioze, coordonator Moga Mînzat R., Ed. Brumar, Timișoara, 325-346;
  10. **Codiță, Irina, Buiuc, D. (2008)** – *Identificarea cocilor Gram pozitivi aerobi și facultativ anaerobi*, în *Tratat de Microbiologie Clinică*, sub redacția BUIUC D., NEGUȚ M., Ed. a-II-a, Ed. Medicală, București.
  11. **Codiță Irina, Buiuc D. (2008)** – *Determinarea sensibilității la antibiotice: teste calitative*, în *Tratat de microbiologie clinică*, ediția a II-a, sub redacția BUIUC D., NEGUȚ M., Ed. Medicală, București, 453-482;
  12. **Codiță I. (1999)** - *Identificarea stafilococilor*, în *Tratat de microbiologie clinică*, sub redacția Buiuc D., Neaguț M., Ed. Medicală, București, 592-606;
  13. **Damian M. (2008)** – *Tehnici bazate pe studiul acizilor nucleici utilizate în diagnosticul și supravegherea microbiologică a bolilor infecțioase*, în *Tratat de microbiologie clinică*, ediția a II-a, sub redacția BUIUC D., NEGUȚ M., Ed. Medicală, București, 125-149;
  14. **Euzeby, J.P. (2011)** – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Genus Staphylococcus*, <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>, (accesat în 17.03.2014).
  15. **Frana T.S. (2012)** – *Staphylococcosis*, în *Diseases of swine*, 10th edition, Ed. Wiley-Blackwell, Iowa, 834-840;
  16. **Ghafari N., Tabatabaei M., Esmailnezhad Z. (2012)** – *Identification of Staphylococcus spp. in bovine milk and teat skin by PCR-RFLP of gap and groEL genes*, Online Journal of Veterinary Research, 16 (4), 215-231;
  17. **Graveland H., Dujiker Van Engeline, Nes Van Arie, Schoormans A., Broekhuizen-Stins M., Oosting-Van Schothorst Isabella, Heederik D., Wagenaar J.A. (2009)** – *Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for the detection of MRSA in nasal swabs from pigs and veal calves*, Veterinary Microbiology, 139 (2009), 121-125.
  18. **Gunn, B.A., Singleton F.L., Peele E.R., Colwell R.R., Keiser J.F., Kapfer C.O. 1981.** Comparison of methods for identifying *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 14:195-200.
  19. **Ieremia T. (1985)** – *Genul Staphylococcus*, în *Bacteriologie medicală*, vol. II, sub redacția Bîlbie V., Pozggi N., Ed. Medicală, București, 17-43.
  20. **Kloos, W.E., Wolfshohl J.F. (1982)** - Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *J. Clin. Microbiol.* 16509-516.
  21. **Nemati, M.; Hermans, K.; Vancraeynest, D.; Vlieghe, S. De; Samptimon, O.C.; Baele, M.; Graef, E.M. De; Pasmans, F.; Haesebrouck, F. (2008)** - *Screening of bovine coagulase -negative staphylococci from milk for superantigen - encoding genes*, Veterinary Record, 163:25, 740-743.
  22. **Perianu, T. (2003)** - *Boli infecțioase ale animalelor – Bacterioze*, Vol. I, Ed. Venus, Iași.
  23. **Perry J.D., Freydière A.M. (2007)** – *The application of chromogenic media in clinical microbiology*, Journal of Applied Microbiology, 103, 2046-2055;
  24. **Petrovski, K.R.; Heuer, C.; Parkinsson, T.J.; Williamsons, N.B. (2009)**- *The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand*, New Zealand Veterinary Journal, 57:2, 109-115.
  25. **Pletinckx L.J., Bleecker Y. De, Dewulf J., Rasschaert G., Goddeeris B.M., Man I. De,**

- (2012) – *Evaluation of salt concentrations, chromogenic media and anatomical sampling sites for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs*, *Veterinary Microbiology*, 154 (3/4), 363-368;
26. **Pletinckx L.J., Dewulf J., Bleecker Y. De, Rasschaert G., Goddeeris B.M., Man I. (2013)** – *Evaluation of different chromogenic media for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 in broilers*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32 (8), 1023-1026.
27. **Popescu Smărăndița M. (2010)** – *Cercetări etiologice în mamitele vacilor*, Teză de doctorat, FMV Timișoara;
28. **Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey B., Cator, G.R. (1994)** - *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolfe Publishing, Spain.
29. **Răducănescu, H., Bica-Popii, V (1986)** – *Bacteriologie veterinară*, Ed. Ceres, București.
30. **Rafila A. (2008)** – *Medii de cultură. Medii de transport și conservare*, în *Tratat de microbiologie clinică*, ediția a II-a, sub redacția Buiuc D., Neaguț M., Ed. Medicală, București, 1045-1100.
31. **Răpunțean, G.H., Răpunțean, S. (2005)** – *Bacteriologie specială veterinară*, Ed. Tipo Agronomia, Cluj-Napoca.
32. **Răpunțean G., Răpunțean S., Fiț N. (2008)** – *Imunologie veterinară*, Ed. AcademicPres, Cluj-Napoca.
33. **Rusu V. (1977)** – *Examene bacteriologice*, în *Metode de laborator - de uz curent*, vol. II, sub redacția Balș M., Ed. Medicală, București, 11-199;
34. **Schissler J.R. (2009)** – *Species identification by Polymerase Chain Reaction of staphylococcal isolates from the skin and ears of dogs and evaluation of clinical laboratory standards institute interpretive criteria for canine methicillin-resistant*, Thesis, The Ohio State University;
35. **Schmidt, K.A., A.C. Manna, S. Gill, Cheung A.L. (2001)**. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69:4749–4758.
36. **Ivana S. (2005)** – *Bacteriologie generală* (Ed. Științelor medicale, București)
37. **Ivana S. (2006)**. – *Tratat de bacteriologie medical-veterinară și introducere în micologie* (Ed. Ș. medicale, București).
38. **Ivana S. (2007)** – *Microbiologie medicală – veterinară, Vol. I*. Ed. Științelor medicale, București.
39. **Ivana S. (2007)** – *Microbiologie medicală – veterinară, Vol. II* (Ed. Științelor medicale, București).
40. **Ivana S. (2008)** - *Practical guide of microbiological diagnosis*, Ed. Orizonturi.
41. **Unnerstad, H.E.; Lindberg, A.; Waller, K.P.; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson-Öst, M.; Bengtsson, B. (2009)** - *Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors*, *Veterinary Microbiology*, 137:1/2, 90-97.
42. **Velescu E, Tănase IO. (2010)** – *Stafilococii*, în *Tratat de boli infecțioase ale animalelor*, Bacterioze, vol. I, sub redacția Perianu T., Ed. Universitas, Iași, 467-489;
43. **Vior C. (2000)** – *Biotehnologii medicale*, Ed. Fundației „România de mâine”, București;
44. **Vior C., Răducănescu H., Tirziu E., Trif R. (2005)** – *Imunopatologie*, Ed. Brumar, Timișoara.
45. **Yamazumi, T.I. Furuta, D.J. Diekema, M.A. Pfaller, Jones R.N. 2001**. Comparison of the Vitek gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-screen latex agglutination test, and mecA analysis for detecting oxacillin resistance in geographically diverse collection of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 39:3633-3636. Abstract/FREE Full Text
46. **Yamazumi, T., Marshall S.A., Wilke W.W., Diekema D.J., Pfaller M.A., Jones R.N. (2001)**. Comparison of the Vitek gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 39:53-56.
47. **Zarnea G. (1983)** – *Tratat de microbiologie generală*, Ed. Academiei Republicii Socialiste România, București.
48. **Zhang J, Yu S, Wang X, Sun Q. (2012)** – *Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from raw milk and milk of clinical mastitis*, *Chinese Journal of Veterinary Science*, 32 (5), 759-764.
49. \*\*\* *Instructions for use the Vitek 2 Compact*, [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
50. \*\*\* [www.biokar-diagnostics.com](http://www.biokar-diagnostics.com)
51. \*\*\* <http://ro.scribd.com/doc/94954408/Curs-8-Stafilococi>
52. \*\*\* <http://www.creeaza.com/familie/medicina/DETERMINAREA-SPECTRULUI-DE-SEN568.php>
53. \*\*\* *Instructions for use the API Systems*, [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)
54. \*\*\* *Ordinul Președintelui ANSVSA nr. 25 din martie 2008 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind metodologia de prelevare, prelucrarea primară, ambalare și transport al probelor destinate examenelor de laborator în domeniul sănătății animalelor*
55. \*\*\* [wikipedia.org/wiki/Analytical\\_profile\\_index](http://wikipedia.org/wiki/Analytical_profile_index)