

MEDIU DE CULTURĂ PENTRU INDICAREA RAPIDĂ A STAFILOCOCILOR IMPLICAȚI ÎN INFECȚIILE TRACTULUI RESPIRATOR

THE CULTURE MEDIUM FOR RAPID INDICATION OF STAPHYLOCOCCUS SPP. INVOLVED IN RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Greta Bălan¹, Olga Burduniuc², Constantin Spînu², Nicolai Furtună²

¹*Catedra Microbiologie, virusologie și imunologie USMF "Nicolae Testemițanu";*

²*Centrul Național de Sănătate Publică*

Rezumat

A fost elaborat un mediu de cultură care permite indicarea rapidă a stafilococilor. Metoda elaborată dă posibilitate de a obține un rezultat preliminar după 9 ore de la momentul inoculării materialului patologic în comparație cu metodele obișnuite. Mediul este sensibil, economic și simplu în utilizare, accesibil pentru laboratoarele microbiologice de diverse niveluri.

Cuvinte cheie: Staphylococcus spp., indicare rapidă, sistemul respirator.

Summary

The culture medium for rapid indication of Staphylococcus spp. involved in respiratory tract infections. It was developed a culture medium that enables rapid indication of staphylococci. The developed method gives the possibility to obtain a preliminary result after 9 hours from the time of inoculation of pathological material, compared to conventional methods. Medium is sensitive, economical and easy to use, accessible for microbiological laboratories of different levels.

Key words: Staphylococcus spp., rapid indication, respiratory system.

Introducere

Infecțiile respiratorii reprezintă cea mai frecvent întâlnită boală la om, fiind motivul principal pentru vizita la medic. Procesul inflamator este mai extensiv la copii decât la adulți, în fiecare an adulții dezvoltând până la 4 episoade de infecții respiratorii acute, în timp ce copiii pot dezvolta între 6-10 astfel de infecții, îmbolnăvirile fiind mai frecvente în sezonul rece.

Infecțiile stafilococice sunt și astăzi o problemă de mare actualitate. Astfel, nicăieri în lume nu se înregistrează o scădere a indicilor morbidității prin infecții stafilococice și procese supurativ – inflamatorii, mai mult de atât, stafilococii patogeni au agravat cu mult situația infecțiilor asociate asistenței medicale în instituțiile curativ – profilactice de copii, în cele de profil chirurgical, urologic, ginecologic etc.

Stafilococii pot dobândi accesul în parenchimul pulmonar pe două cai: aspirația florei din căile aeriene superioare și diseminare hematogenă. Pneumonia stafilococică este relativ neobișnuită, dar produce o infecție severă. Ea apare frecvent după intubația traheală la pacienții spitalizați sau după infecții virale ale tractului respirator [1, 3].

Deoarece infecțiile tractului respirator se înregistrează frecvent în practica medicală, este binevenită perfecționarea și elaborarea metodelor rapide de izolare și identificare a microorganismelor care servesc drept factori etiologici ai

patologiei date, ce ar permite tratamentul precoce și prevenirea complicațiilor.

Material și metode

Cercetările au fost efectuate utilizând materiale și reactive standarde înregistrate în Republica Moldova de Ministerul Sănătății. Tulpinile de referință au fost primite de la laboratorul bacteriologic al Centrului Național de Sănătate Publică. În studiu au fost incluse 112 prelevate de la pacienții cu diverse patologii ale sistemului respirator. Izolarea agentului cauzal s-a făcut pe medii selective și neselective adecvate, iar identificarea tulpinilor izolate s-a făcut prin metode convenționale și automate (BD Phoenix) [2,4,5].

Rezultate și discuții

Investigațiile științifico-teoretice și experimentale efectuate de noi au permis elaborarea unui mediului de cultură MSD-St (Mediu Selectiv Dozat), care permite indicarea rapidă a stafilococilor în prelevat și aprecierea etiologiei microbiene în procesul patologic. Pentru a favoriza creșterea și multiplicarea stafilococilor, am selectat în calitate de nutrienți bulionul peptonat, hidrolizatul de cazeină și glucoza, ca factor selectiv am utilizat clorura de sodiu, iar ca indicator, pentru determinarea scindării glucozei de către stafilococi, roșu de fenol. Bulionul peptonat, cazeina hidrosolubilă și glucoza se introduc în calitate de bază nutritivă, care favorizează creșterea și multiplicarea

stafilococilor, iar împreună cu gelatina, zaharoza formează mediul de cultură sub formă de peliculă cristalizată, care stabilizează mediul și mărește durata lui de păstrare. Clorura de sodiu atribuie mediului selectivitate, inhibând creșterea și multiplicarea altor microorganisme. Hidrogenofosfatul de sodiu împreună cu dihidrogenofosfatul de potasiu permite stabilirea pH 7,2-7,4, optim pentru multiplicarea stafilococilor. Roșu de fenol permite determinarea glucozidazei stafilococilor prin schimbarea culorii în urma virării pH-ului spre acid. Mediul este

fixat la fundul unui flacon cu volumul de 10,0 ml, care servește și drept vas pentru multiplicarea și indicarea stafilococilor.

Pentru prepararea mediului MSD-St au fost testate 10 variante de îmbinare a ingredientelor. În urma cercetărilor repetate optimă s-a dovedit a fi varianta 10, care include bulion peptonat, hidrolizat de cazeină, glucoză, clorură de sodiu, gelatină, dihidrogenofosfat de potasiu, hidrogenofosfat de sodiu și roșu de fenol (tab.1).

Tabelul 1

Influența ingredientelor mediului MSD-St asupra indicării stafilococilor

Nr d/r	Ingredientele mediului	Variantele componenței mediului și rezultatele indicării									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Bulion peptonat	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Cazeină hidrolizată	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	Glucoză	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
4.	Zaharoză	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5.	Gelatină	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
6.	Clorură de sodiu	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7.	Fosfat monopotasice	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
8.	Fosfat disodic	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
9.	Roșu fenol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Indicarea stafilococilor timp de 9 ore		⌘	X	⌘	∅	∅	∅	⌘	⌘	X	∅

Notă: „+” – prezența ingredientului; „-” – lipsa ingredientului; X – creșterea și multiplicarea stafilococilor ce permite indicarea lor după 24 ore de incubare la 37°C; ⌘ - nu permite indicarea stafilococilor; ∅ - creșterea și multiplicarea stafilococilor permite indicarea lor timp de până la 9 ore de incubare la 37°C.

Variantele 4,5 și 6 la fel permit indicarea stafilococilor timp de până la 9 ore, însă la omiterea clorurii de sodiu mediul este lipsit de selectivitate, iar lipsa gelatinei și zaharozei nu permit formarea mediului sub formă de peliculă care stabilizează

mediul și mărește durata lui de păstrare.

De asemenea, am stabilit sensibilitatea mediului în funcție de componența cantitativă al ingredientelor. Pentru aceasta au fost testate 5 variante de componență cantitativă a mediului MSD-St (tab.2).

Tabelul 2

Sensibilitatea mediului MSD-St la indicarea stafilococilor în funcție de conținutul cantitativ al ingredientelor (în % de masă)

N	Bulion peptonat	Cazeină hidrolizată	Glucoză	Zaharoză	Gela tină	Clorură de sodiu	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	Roșu de fenol	Concentrația inițială a stafilococilor și indicarea lor timp 9 ore de incubare la 37°C, c.m./ml			
										10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
1	12,24	4,71	12,24	0,11	4,71	56,48	3,76	5,65	0,11	+	+	-	-
2	11,49	4,92	11,49	0,12	4,92	57,43	4,10	5,41	0,12	++	++	++	++
3	11,42	5,71	11,42	0,11	5,71	57,12	3,63	4,76	0,11	++	++	++	++
4	11,37	6,31	11,37	0,11	6,31	56,83	3,28	4,29	0,11	++	++	++	++
5	10,89	6,31	10,89	0,12	6,31	57,34	3,44	4,59	0,12	+	+	-	-

Notă: „+++” – reacție pozitivă (culoare galbenă intensă); „++” – reacție slab pozitivă (culoare gălbuie); „-” – reacție negativă (culoare roșie).

Experimental am stabilit că varianta 3 conține ingredientele în raportul optim pentru indicarea rapidă a stafilococilor. Trebuie menționat faptul că la prepararea mediului pentru efectuarea unei analize, ingredientele se utilizează în cantități

minime, ceea ce-l face destul de econom.

Pentru a determina durata de păstrare a mediului MSD-St, l-am testat timp de 12 luni (tab.3).

Tabelul 3

Durata păstrării proprietăților indicatorii ale mediului MSD-St

Intervalul observărilor	Timpul indicării stafilococilor în concentrațiile inițiale 1-10 c.m./ml, în ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
30 zile	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
3 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
6 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
9 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
10 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
12 luni	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++

Notă: “-” - culoare inițială roșie (rezultat negativ); “+” - culoare galben-deschis (rezultat slab pozitiv); “++” - culoare galbenă (rezultat pozitiv).

Experimentele au arătat că mediul MSD-St sub formă de micropeliculă uscată și fixată la fundul recipientului poate fi păstrat la temperatura camerei, fără ași schimba proprietățile inițiale, timp de 1 an (termen de observare).

Pentru indicarea stafilococilor în flaconul cu mediu pelicular se introduc 2,0 ml de apă distilată sterilă în care se dizolvă pelicula, obținându-se o soluție de culoare roșie. Apoi se însămânțează tulpina de stafilococ în concentrația

de $10^1 - 10^9$ c.m./ml. Flaconul se incubează la temperatura de 37°C până la 9 ore. În cazul prezenței stafilococilor, culoarea mediului se schimbă în galben, sub acțiunea metaboliților acestora, pe când în flaconul martor (mediu fără cultură de stafilococ) culoarea rămâne roșie.

Timpul indicării stafilococilor depinde de concentrația inițială a acestora într-un mililitru de material examinat (tab.4).

Tabelul 4

Timpul indicării stafilococilor în funcție de concentrația lor inițială

Concentrația microorganismelor (c.m./ml)	Timpul indicării, ore									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
10^1	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
10^2	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
10^3	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
10^4	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
10^5	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
10^6	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++
10^7	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++
10^8	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++
10^9	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++
2 mld. și mai mult	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Notă: “++” – reacție pozitivă pronunțată; „+” – reacție pozitivă; „-” – reacție negativă.

După cum ne-au demonstrat experimentele realizate, indicarea celulelor unice de stafilococi este posibilă deja peste 8-9 ore de incubare, iar a concentrațiilor 10^4-10^5 c.m./ml peste 5-6 ore de incubare la temperatura de 37°C .

Pentru determinarea selectivității și specificității mediului MSD-St am recurs la efectuarea experiențelor în serie, cu 4 loturi de microorganisme în asociație, în 30 de repetiții. La formarea asociațiilor microbiene am selectat microorganismele cel mai frecvent implicate în infecțiile tractului respirator (tab.5).

În urma cercetărilor efectuate am stabilit că mediul MSD-St dispune de selectivitate înaltă față de stafilococi, în funcție de concentrația lor inițială și a microorganismelor din asociație. Conform datelor din tabelul 5, indicarea stafilococilor în concentrație de 10^5 c.m./ml din asociațiile microbiene *Staphylococcus aureus* 10^5 c.m./ml + *Pseudomonas aeruginosa* 10^6 c.m./ml; *Staphylococcus aureus* 10^5 c.m./ml + *Escherichia coli* 10^6 c.m./ml; *Staphylococcus epidermidis* 10^5

c.m./ml + *S.pyogenes* 10^6 c.m./ml este posibilă după 6 ore de incubare la temperatura de 37°C , iar în concentrații de 10^2 , 10^3 , 10^4 c.m./ml după 9 ore.

Am stabilit veridicitatea statistică a indicilor aprecierii selectivității mediului MSD-St din asociația microorganismelor *Staphylococcus aureus* 105 c.m./ml + *Pseudomonas aeruginosa* 106 c.m./ml; *Staphylococcus aureus* 105 c.m./ml + *Escherichia coli* 106 c.m./ml; *Staphylococcus epidermidis* 105 c.m./ml + *S.pyogenes* 106 c.m./ml în comparație cu asociațiile în care concentrația stafilococilor este de 102, 103, 104 c.m. în 1 ml ($P < 0,001$).

De asemenea am stabilit veridicitatea statistică între indicii indicării stafilococilor din asociațiile de microorganisme timp de 6 ore și 9 ore ($P_{6;9}$), și 9 ore și 24 ore ($P_{6;24}$), unde ($0,05 > P < 0,001$).

Putem conchide că mediul MSD-St dispune de selectivitate înaltă față de stafilococi, inhibând creșterea și multiplicarea microorganismelor din asociație.

Tabelul 5

Selectivitatea mediului MSD-St

Nr. d/o	Specia de microorganisme în asociație (c.m./ml)	Nr. experimentului	Indicarea, în ore			P	
			6	9	24	6;9 ore	9;24 ore
			% ± ESp	% ± ESp	% ± ESp		
1.	S.aureus (10 ²) P.aeruginosa (10 ⁶)	29	0	93,1±2,9	100±0,0	-	<0,05
2.	S.aureus (10 ²) E.coli (10 ⁶)	28	0	96,4±2,6	100±0,0	-	<0,05
3.	S.epidermidis (10 ²) S.pyogenes (10 ⁶)	30	0	93,3±2,7	96,6±2,4	-	<0,05
4.	S.aureus (10 ³) P.aeruginosa (10 ⁶)	29	0	89,7±2,9	96,6±2,3	-	<0,05
5.	S.aureus (10 ³) E.coli (10 ⁶)	30	0	90±2,8	96,6±2,4	-	<0,05
6.	S.epidermidis (10 ³) S.pyogenes (10 ⁶)	30	0	93,3±2,7	100±0,0	-	<0,05
7.	S.aureus (10 ⁴) P.aeruginosa (10 ⁶)	30	10,0±0,7	93,3±2,7	96,6±2,4	<0,001	<0,05
8.	S.aureus (10 ⁴) E.coli (10 ⁶)	28	7,2±0,4	96,4±2,6	100±0,0	<0,001	<0,05
9.	S.epidermidis (10 ⁴) S.pyogenes (10 ⁶)	30	16,7±0,9	100±0,0	100±0,0	<0,001	-
10.	S.aureus (10 ⁵) P.aeruginosa (10 ⁶)	29	13,8±0,8	96,6±2,4	100±0,0	<0,001	<0,05
11.	S.aureus (10 ⁵) E.coli (10 ⁶)	30	16,7±0,9	96,6±2,4	100±0,0	<0,001	<0,05
12.	S.epidermidis (10 ⁵) S.pyogenes (10 ⁶)	30	23,3±1,2	100±0,0	100±0,0	<0,001	-

Pentru determinarea sensibilității mediului MSD-St am efectuat în serie experimente cu 5 tulpini de stafilococi în 2 concentrații 10⁴, 10⁵ c.m. în 1 ml, în 11-13 de repetiții. Paralel am efectuat însămânțarea pe mediile geloză salină cu gălbenuș de ou și geloză-sânge (tab.6). Am stabilit că MSD-St este mult mai sensibil față de mediile geloză salină cu gălbenuș de ou și geloză-sânge și permite indicarea stafilococilor timp de 6 ore de incubare la temperatura de 37°C la o concentrație de 10⁴ c.m./

ml în 58,2% din cazuri; la o concentrație de 10⁵ c.m./ml în 100% din cazuri, în comparație cu 18-24 ore la utilizarea mediilor geloză salină cu gălbenuș de ou și geloză-sânge.

Au fost examinate 112 prelevate recoltate de la pacienți cu diverse patologii ale tractului respirator. În 32 cazuri au fost indicate tulpini de Staphylococcus spp. Rezultatele obținute prin metoda rapidă au fost confirmate în 100% cazuri prin metoda obișnuită.

Tabelul 6

Sensibilitatea indicării stafilococilor cu mediul MSD-St în comparație cu mediile geloză salină cu gălbenuș de ou și geloză-sânge

Nr d/r	Specia microorganismelor	Nr. exp.	Concentrația microorganismelor și indicarea lor (după culoare) după 6 ore de incubare la temperatura de 37°C, c.m./ml					
			MSD-St		Geloză salină ou		Geloză-sânge	
			10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵
			%±ESp	%±ESp	%±ESp	%±ESp	%±ESp	%±ESp
1.	S.aureus ATCC 25923	13	53,8±1,5	100±0,0	0	0	0	0
2.	S.aureus ATCC 12600	12	66,7±1,7	100±0,0	0	0	0	0
3.	S.aureus*	12	58,3±1,2	100±0,0	0	0	0	0
4.	S.epidermidis ATCC14990	11	45,5±1,1	100±0,0	0	0	0	0
5.	S.saprophyticus ATCC 15305	12	66,7±1,7	100±0,0	0	0	0	0
Total		60	58,2±0,9	100±0,0	0	0	0	0

Notă: *- tulpină clinică

Concluzii

Mediul MSD-St dispune de selectivitate, permite cultivarea, acumularea și indicarea stafilococilor în concentrații inițiale de 10¹-10² c.m./ml timp de 8 - 9 ore, iar în concentrații de 10⁴-10⁵ c.m./ml - după 5-6 ore de incubare la temperatura de 37°C. Forma de prezentare a mediului de cultură sub formă de peliculă

uscată asigură păstrarea lui îndelungată (termen de observație 12 luni). Mediul este econom, simplu în utilizare, accesibil pentru laboratoarele microbiologice de diverse niveluri. Mediul propus permite izolarea și identificarea rapidă al agentului cauzal, ceea ce permite indicarea tratamentului precoce și prevenirea complicațiilor.

Bibliografie:

- Almaș A., Flonta M., Petrașcu M., Năstase V. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de Staphylococcus aureus izolate din infecții ale tegumentelor și părților moi. În: Clujul Medical, 2011; 84(2):173-7.
- Buiu D. Microbiologie medicală: Ghid pentru studiul și practica medicinei. Iași, 2008, p. 320-385.
- Petrache S., Miftode E. ș.a. Particularitățile clinice și microbiologice ale infecțiilor cu Staphylococcus aureus în Spitalul de Boli Infecțioase Iași. Rev.Med.Chir.Soc.Med.Nat. Iași, 2009, p. 624-628.
- Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Москва, 1982. 445 с.
- Лабинская А.С., Блинова Л.П., Ещина А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. Москва, 2005, 600с.