

STUDIUL FENOTIPIC ȘI GENOTIPIC AL TULPINILOR DE STAFILOCOCI IZOLATE DE LA ANIMALE

REZUMAT

Stafilococii sunt bacterii Gram pozitive, considerate ubicvitare, care au ca habitat pielea și mucoasele, atât la animale, cât și la oameni. Aceste bacterii sunt prezente în mediul extern și în micromediu, având ca substrat solul, apa, aerul, așternutul, instalațiile și ustensilele din adăposturi, inventarul din clinicile veterinare și din spitale, ustensilele și instalațiile din fabricile de procesare a produselor animale, precum și alimentele de origine animală destinate consumului uman. Aceste substraturi reprezintă rezervoare și surse secundare de infecție pentru animale și pentru oameni.

În ultimii ani, de la animale, dar și de la oameni, sunt izolate mai multe specii de stafilococi coagulază negativi (SCN), care pot produce diferite infecții localizate, atât la animale, cât și la oameni, cele mai cunoscute fiind infecțiile nosocomiale.

Stafilococii manifestă o agresivitate pronunțată pentru țesuturi și organe, bazată pe existența unor atribute de patogenitate, reprezentate de virulență, toxicitate și formarea biofilmului. Acești factori de patogenitate sunt codificați genetic, genele respective fiind prezente în cromozom și în elementele genetice mobile existente în citoplasmă.

Stafilococii sunt considerați bacterii cu risc zoonotic, animalele reprezentând un rezervor de infecție important pentru oameni, existând un circuit epidemiologic complex, atât între animalele de rentă și oameni, cât și între animalele de companie și oameni, însă stafilococii pot trece și de la oameni la animale.

Rezistența multiplă la antibiotice, la stafilococi, este considerată un factor de risc zoonotic pronunțat, deoarece fenotipurile (pattern-urile) de rezistență, existente la stafilococi, au o frecvență în continuă creștere, atât la animalele de rentă, cât și de companie, iar tulpinile care prezintă acest fenomen au un circuit epidemiologic complex. Aceste fenotipuri prezente la tulpinile de stafilococi, izolate de la animale, sunt monitorizate permanent, deoarece, pe baza lor, este stabilită conduita terapeutică și este urmărit circuitul tulpinilor.

Inițial la *S. aureus subsp. aureus* și, ulterior, la alte specii, a fost semnalată rezistența față de meticilină, iar tulpinile rezistente, la acest antibiotic, au fost denumite generic tulpini de tip MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Extinderea fenomenului de meticilin rezistență a determinat efectuarea unor studii numeroase, deoarece aceste tulpini au ajuns și la oameni, fiind considerate tulpini cu risc zoonotic. Rezistența față de meticilină apare ca urmare a intervenției unor proteine de legare a penicilinelor, a căror sinteză este codificată de caseta *SCCmec*. Pentru detecția

rezistenței la meticilină a fost propusă, din anul 2004, oxacilina, iar din anul 2005, cefoxitinul, deoarece rezultatele obținute, cu aceste două beta-lactamine, sunt mult mai fiabile.

Teza de doctorat cuprinde 284 pagini, 38 tabele și 87 figuri, în care sunt incluse 52 de imagini originale și 35 de grafice. Suportul științific al tezei este reprezentat de 300 titluri bibliografice, care includ lucrări științifice, tratate, teze de doctorat și pagini web.

Teza de doctorat este structurată în două părți, respectiv “Cercetările bibliografice”, incluse în partea a I-a și “Cercetările proprii”, incluse în partea a II-a.

Partea a I-a

CERCETĂRI BIBLIOGRAFICE

Prima parte a tezei, reprezintă un studiu bibliografic, structurat în două capitole, fiind extinsă pe un număr de 74 pagini (26,06%). În această parte se regăsesc 3 tabele și 3 figuri reprezentative alături de date actuale privind genul *Staphylococcus*.

CAPITOLUL 1. FAMILIA STAPHYLOCOCCACEAE. GENUL STAPHYLOCOCCUS

Primul capitol reprezintă o sinteză a datelor din literatura de specialitate, riguros selectate cu privire la sistematica genului *Staphylococcus*. Este prezentată taxonomia acestui gen, preluată din www.bacterio.net/~allnamesz.html, care include List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, coordonat de Prof. Dr. EUSZÉBY J. P.

În cadrul capitolului, sunt prezentate sintetic ultimile date privind ecologia, morfologia, structura antigenică și factorii de patogenitate. De asemenea, capitolul include și date actuale privind genetica acestor bacterii, antibioretistența multiplă și fenomenul de meticilin rezistență. Sunt prezentate și speciile de stafilococi patogene pentru animalele de rentă și de companie, precum și entitățile morbide produse.

CAPITOLUL 2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE CU STAFILOCOCI LA ANIMALE

În acest capitol este prezentată o amplă sinteză bibliografică, privind diagnosticul infecțiilor stafilococice la animale. Sunt redată tehnicile de recoltare a probelor, materialele patologice, precum și transportul acestora. O atenție deosebită este acordată examenului bacteriologic, privind atât identificarea primară, cât și identificarea definitivă, precum și mediile de cultură, testele curente și

sistemele comerciale. De asemenea, este prezentată identificarea clonală, detecția toxinei și testele de biologie moleculară, utilizate în ultimii ani.

Partea a II-a

CERCETĂRI PROPRII

Partea a II-a include cercetările proprii, fiind structurată în 6 capitole (3-8), extinse pe un număr de 210 pagini (73,94%). Această parte a tezei este ilustrată de 35 tabele și 84 figuri, în care sunt incluse 49 imagini originale și 35 de grafice.

CAPITOLUL 3. SCOPUL, MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Stafilococii sunt bacterii patogene, condiționat patogene și oportuniste, în funcție de specie și în funcție de prezența unor factori favorizanți. Au tropism marcat pentru piele și pentru mucoase, producând infecții localizate supurative, septicemii și entități infecțioase, bine conturate, care evoluează la animale și la oameni, denumite generic stafilococi. În unele situații, pot interveni și ca agenți patogeni secundari, în principal după unele viroze .

La animale evoluează stafilococii, bine conturate, ca entități infecțioase, distincte epidemiologic și anatomoclinic, cu evoluție septicemică și/sau localizată, distingându-se ca frecvență, importanță economică și sanitară mastitele infecțioase ale vacilor de lapte.

În funcție de patogenitatea speciei de stafilococ și de evoluția clinică a entităților produse, majoritatea cercetătorilor fac distincție între *S. aureus subsp. aureus*, specia tip a genului, considerată specia cea mai patogenă și alte specii de stafilococi coagulază pozitivi și coagulază negativi, incluse într-o grupă denumită generic stafilococi “non-*S. aureus*”.

Mecanismele de patogenitate se desfășoară într-o succesiune complexă, în care intervin enzimele extracelulare și toxinele, care acționează ca și în ele într-o reacție biochimică ramnificată și mai puțin sub formă individualizată. Stafilococii pătrund în organism la nivelul pielii și mucoaselor prin glandele sebacee, sudoripare, foliculii piloși, microleziuni și leziuni de dimensiuni mai mari. Procesul infecțios incipient (local) este consecința numărului, virulenței și toxicității tulpinii și a capacității mecanismelor de apărare locală, a organismelor gazdă, care intervin prin fagocitoză, respectiv prin granulocitele neutrofile mobilizate și potențate prin opsonizare și prin liză de către sistemul complement. Infecțiile stafilococice repetate, la nivelul pielii, pot declanșa o hipersensibilizare sau alergie față de unele antigene stafilococice.

Studiile efectuate au demonstrat că antibioretistența este determinată genetic, având ca suport foarte multe gene de rezistență situate în cromozomul bacterian, plasmidele R, intergoni și

transpozoni, care reprezintă elementele genetice mobile. Prin intermediul acestora, genele care codifică rezistența la antibiotice pot fi transferate între tulpinile aceleiași specii bacteriene (transmitere intraspecifică), precum și între tulpini care aparțin altor specii bacteriene (transmitere interspecifică). De asemenea, cercetările au mai demonstrat că plasmidele R reprezintă principalii factori ai rezistenței extracromozomale la antibiotice, mai ales cele de tip conjugativ care conțin 3 grupe de gene, respectiv gene care controlează transferul, gene care codifică autoreplicarea și gene care codifică rezistența față de antibiotice. Aceste gene au fost detectate și studiate cu ajutorul unor tehnici de biologie moleculară, cea mai utilizată tehnica PCR, în mai multe variante.

Numeroase colective de cercetare efectuează studii ample de screening, pentru a monitoriza circuitul epidemiologic al tulpinilor meticilin rezistente, în acest scop, fiind utilizate atât tehnicile clasice fenotipice, cât și metodele de biologie moleculară, care sunt mai rapide și care permit detecția *SCC_{mec}*, care codifică rezistența față de acest antibiotic.

Având în vedere aspectele prezentate anterior, în cadrul cercetărilor care fac obiectul tezei de doctorat, au fost urmărite mai multe obiective:

- ✓ studiul cultural, morfologic și tinctorial al tulpinilor de stafilococi izolate;
- ✓ studiul profilului biochimic, cu ajutorul unui sistem multitest și pe baza activității glucidolitice;
- ✓ utilizarea unor medii cromogene pentru discriminarea tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus* și a tulpinilor de tip MRSA;
- ✓ stabilirea frecvenței unor specii de stafilococi izolate de la animale;
- ✓ studiul unor factori de patogenitate existenți la tulpinile izolate;
- ✓ simplificarea schemei de izolare și de tipizare primară a tulpinilor izolate;
- ✓ cercetarea prezenței coagulazei libere ca factor de patogenitate și de diferențiere a tulpinilor în cele două grupe;
- ✓ studierea fenotipurilor (pattern-urilor) de rezistență la tulpinile izolate;
- ✓ studierea fenomenului de meticilin rezistență la tulpinile izolate;
- ✓ detecția genei *mec* la tulpinile de stafilococi meticilin rezistente, cu ajutorul tehnicii PCR;
- ✓ diferențierea tulpinilor de *S. intermedius* față de tulpinile de *S. pseudintermedius*, cu ajutorul tehnicii PCR;
- ✓ identificarea clonală a tulpinilor de *S. intermedius/S. pseudintermedius* izolate de la câini și pisici.

CAPITOLUL 4. IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA FENOTIPICĂ A TULPINILOR DE STAFILOCOCI

La animale și la oameni stafilococii produc diferite infecții localizate sau boli infecțioase care sunt bine conturate, prezentând importanță economică și sanitară. În ultimii ani, a crescut rolul stafilococilor coagulază negativi (SCN) în etiologia unor infecții localizate, dintre care se disting ca frecvență și importanță mastitele subclinice la vacile de lapte sau diferite infecții cutanate sau cu localizare în unele organe la suine și la animalele de companie. Aceste bacterii au tropism pentru epitelii (piele și mucoase), însă datorită echipamentului agresiv, de care dispun, reprezentat de enzime, toxine și alți factori de patogenitate, pot invada orice țesut sau organ. Infecțiile naturale, la oameni și animale, sunt influențate de mai mulți factori legați de: organismele gazdă, existența unor factori favorizanți și de speciile de stafilococi.

Cercetările care fac obiectul acestui capitol au avut ca obiectiv principal caracterizarea fenotipică a tulpinilor de stafilococi izolate de la animale de rentă și de companie, sănătoase sau cu diferite infecții localizate sau generalizate.

4.1. MATERIALE ȘI METODE

Probele de material patologic au fost prelevate de la mai multe specii de animale, urmând a fi supuse examenului bacteriologic, efectuat în conformitate cu metodologia de izolare și tipizare a stafilococilor.

4.1.1. Recoltarea, transportul și însămânțarea primară a probelor

Probele cu material patologic au fost prelevate de la animale din mai multe specii și categorii de vârstă, cu diferite afecțiuni, sau clinic sănătoase, de rentă și de companie (tabelul 4).

Pentru prelevarea probelor, de pe **piele**, au fost utilizate tampoanele sterile, **secrețiile nazale** au fost prelevate tot cu tampoane sterile, iar **secrețiile uterovaginale** au fost prelevate cu tampoane de vată sterile fixate pe o tijă de plastic mai lungă.

Probele de **lapte mastitic** au fost recoltate, steril, de la un număr de 22 de vaci primipare, la care mastitele subclinice au debutat și evoluat la 45-60 zile de la fătare, fiind afectate unul, două sau chiar trei sferturi mamare, iar de la oi și capre cu mamită gangrenoasă probele de **secreții patologice mamare** au fost recoltate, în flacoane sterile.

Probele prelevate de la animale

Nr. crt.	Specia	Categoria de vârstă	Nr. probe recoltate	Nr. probe sterile	Nr. probe pozitive	
					Nr.	%
1.	Ovine	miei	22	1	21	-
		adulte	54	5	49	-
		Total	76	6	70	17,5
2.	Caprine	adulte	30	3	27	6,75
		viței	13	0	13	-
3.	Bovine	adulte	15	2	13	-
		mamite subclinice	52	0	52	-
		Total	80	2	78	19,5
4.	Cabaline	mânji	10	0	10	-
		tineret	10	0	10	-
		iepe mame	12	0	12	-
		adulti	20	1	19	-
		Total	52	1	51	12,75
5.	Suine	purcei	26	3	23	-
		scroafe	27	0	27	-
		porci la îngrășat	26	2	24	-
		Total	79	5	74	18,5
6.	Câini	adulti	55	5	50	12,5
7.	Pisici	adulte	28	3	25	6,25
8.	Iepuri	ieपुरași	11	4	7	-
		ieपुरoaiice	4	1	3	-
		adulti	5	0	5	-
		Total	20	5	15	3,75
9.	Păsări	adulte	10	0	10	2,5
TOTAL			430	30	400	100

Însămânțările primare au fost efectuate în bulion nutritiv sau în apă peptonată, în funcție de materialul patologic prelevat. Ulterior, eprubetele cu aceste medii au fost introduse la termostat, timp de 18-20 de ore la temperatura de 37°C, pentru obținerea **culturilor primare**. Din aceste culturi au fost efectuate frotiuri colorate Gram și au fost efectuate însămânțări pe mediile speciale destinate izolării și tipizării tulpinilor de stafilococi.

4.1.2. Mediile de cultură utilizate

Pentru izolarea primară a tulpinilor de stafilococi din materialele patologice prelevate și, ulterior, pentru caracterizarea fenotipică a tulpinilor de stafilococi, au fost utilizate medii uzuale și medii speciale, care au evidențiat mai multe proprietăți biochimice ale acestor bacterii, pe baza cărora s-a putut face o identificare minimală, urmată de tipizarea definitivă a tulpinilor izolate.

Mediile utilizate au fost: apă peptonată, bulion simplu, agar Mueller Hinton, mediul Chapman, agar cu sânge defibrinat de oaie 7%, mediul Baird-Parker, mediul Chromatic Staph, mediul

Chromatic MRSA, mediul cu roșu de Congo, apa peptonată cu albastru de bromtimol și agarul nutritiv standard.

4.1.3. Sistemul API Staph

Identificarea, la nivel de specie, a tulpinilor de stafilococi (64 tulpini), izolate din probele de lapte mastitic, recoltate numai de la vaci primipare, cu mastite subclinice, a fost realizată prin utilizarea microtestului **API Staph** și a programului software **Apiweb** de interpretare.

4.1.4. Testul evidențierii catalazei

Pentru evidențierea prezenței catalazei a fost utilizat peroxidul de hidrogen, soluție 3%, care a fost adăugat în eprubetele cu culturile de stafilococi, în cantitate de 1 ml, culturile fiind examinate timp 5-10 minute pentru evidențierea bulelor de gaz.

4.1.5. Testele pentru evidențierea coagulazei libere și legate

Coagulaza liberă, difuzibilă, a fost evidențiată prin testul în tuburi cu plasma de iepure liofilizată și cu ajutorul mediului Baird-Parker, iar **coagulaza legată**, denumită și “clumping factor” a fost evidențiată cu ajutorul kiturilor Staphylo Rapid Test și Staph Latex kit.

4.1.6. Examenul bacterioscopic și cultural

Examenul cultural. Culturile obținute, în urma însămânțărilor primare și în urma însămânțărilor pe mediile amintite anterior, au fost examinate cu ochiul liber și cu lupa stereoscopică, fiind apreciate următoarele caractere: turbiditatea pe mediile lichide, forma, mărimea, pigmentogeneza și virarea culorii pe mediile solide utilizate, prezentate anterior.

Examenul bacterioscopic. Au fost efectuate frotiuri, colorate Gram, din colonii izolate, caracteristice, cu scopul de a evidenția caracterelor morfologice și tinctoriale.

4.1.7. Testarea rezistenței la furazolidon și novobiocin

Testul de sensibilitate la novobiocin a fost efectuat pentru a diferenția unele specii de stafilococi coagulază negativi față de speciile de stafilococi coagulază pozitivi.

Testul de sensibilitate la furazolidon a fost folosit pentru a diferenția tulpinile de stafilococi față de tulpinile de micrococi. Principiul acestui test constă în faptul că stafilococii sunt sensibili la compușii bacteriostatici, din clasa furanilor, în timp ce micrococii sunt rezistenți.

4.2. REZULTATELE OBTINUTE

4.2.1. Rezultatele obținute privind identificarea preliminară

4.2.1.1. Rezultatele examenului cultural și bacterioscopic

În **apa peptonată**, culturile primare au produs o turbiditate variabilă, unele culturi producând și un depozit necaracteristic, ușor omogenizabil, iar în **bulion**, culturile primare au produs o turbiditate intensă cu un depozit necaracteristic, ușor omogenizabil, iar unele tulpini au format un inel discret la suprafață.

Pe **mediul Chapman** tulpinile manită pozitive au crescut bine, au fermentat manita, producând virarea culorii indicatorului de pH, iar tulpinile manită negative au crescut, însă nu au fermentat manita, iar indicatorul de pH nu a virat culoarea. La unele tulpini, fermentarea manitei a fost tardivă, respectiv la 48 de ore.

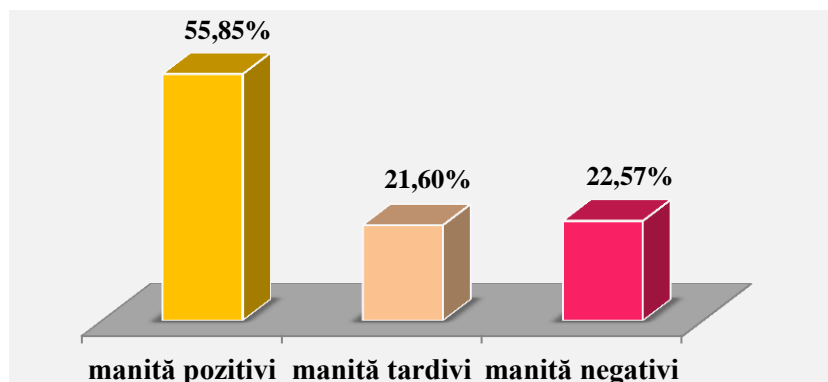


Figura 45. Frecvența tulpinilor de stafilococi privind fermentarea manitei

Pe **agarul cu sânge defibrinat de oaie 7%**, au format colonii rotunde, bombate și neuniforme cu un diametru de 1-6 mm, unele colonii au fost opace, iar altele au avut aspect cremos.

Pigmentogeneza coloniilor a fost diferită, în funcție de specia de stafilococ, coloniile fiind pigmentate în galben-portocaliu, galben-auriu, galben-palid sau având culoare albă.

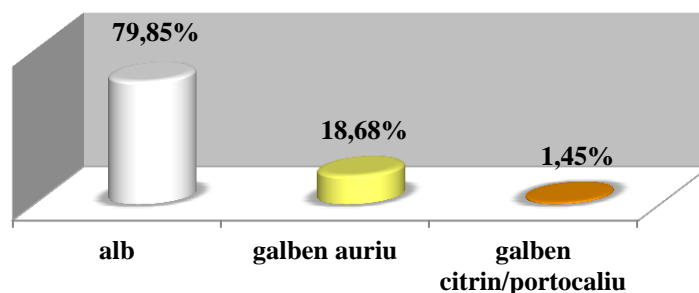


Figura 47. Frecvența tipurilor de pigment

Pe acest mediu a fost apreciat și tipul de **hemoliză**, astfel, unele tulpini au produs o hemoliză totală, sub forma unei zone circulare în jurul coloniilor (**hemoliza de tip β**), alte tulpini au produs o zonă de hemoliză incompletă, de tip „cald-rece”, iar alte tulpini au fost **nehemolitice**.

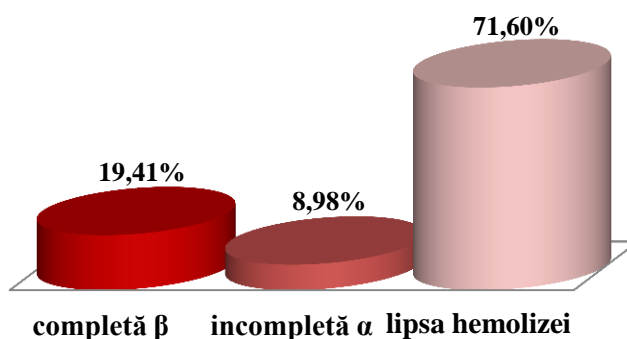


Figura 46. Frecvența tipurilor de hemoliză

Pe **mediul Baird-Parker** au fost testate 412 tulpini de stafilococi, izolate de la animale. După o incubație de 24 de ore, la 37°C, tulpinile care au sintetizat *coagulaza liberă*, au format colonii de dimensiuni medii, de culoare neagră strălucitoare, înconjurată de un halou clar. Tulpinile de stafilococi care nu au sintetizat *coagulaza liberă*, nu au produs aceste modificări caracteristice, coloniile fiind de culoare neagră strălucitoare și fără halou în jur.

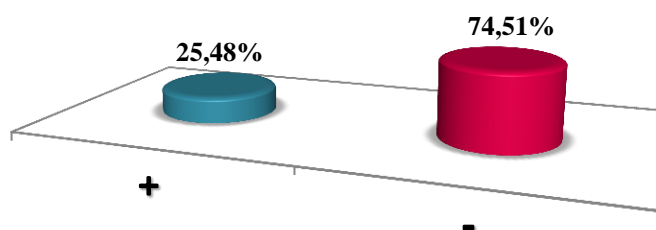


Figura 51. Frecvența tulpinilor coagulază pozitive și coagulază negative pe mediul Baird-Parker

Mediul Chromatic™ Staph aureus este un mediu cromogen selectiv, destinat identificării rapide a tulpinilor de *S. aureus subsp. aureus*, care formează colonii roz-purpurii, iar alte specii de stafilococi formează colonii cu diferite nuanțe de verde și albastru.

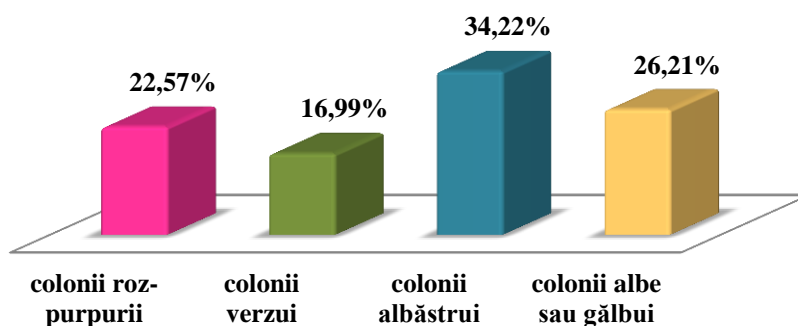


Figura 54. Frecvența tipurilor de colonii pe mediul Chromatic™ Staph aureus

Mediul Chromatic™ MRSA. Tulpinile de *S. aureus subsp. aureus*, rezistente la cel puțin unul din cele trei antibiotice, (MET, OX, FOX) au format colonii colorate mov sau portocaliu, de diferite nuanțe, iar tulpinile de stafilococi „non-*S. aureus*” rezistente la unul din cele trei antibiotice au format colonii albe sau albastre.

Pe **mediul cu roșu de Congo**, tulpinile de *S. aureus subsp. aureus*, care au capacitatea de a produce **biofilm**, formează colonii negre, iar tulpinile de *S. aureus subsp. aureus* care nu produc biofilm, formează colonii roșii sau albe, cele 35 tulpini, supuse testării, au format colonii roșii sau albe, ceea ce sugerează că nu au fost producătoare de biofilm.

4.2.1.2. Rezultatele obținute privind prezența catalazei și a coagulazelor

Pentru producerea **catalazei** a fost utilizată *varianta 1*, respectiv cu culturi integrale în bulion, în care a fost introdusă soluția de 3% peroxid de hidrogen, după care culturile au fost examinate pentru evidențierea bulelor de gaz.

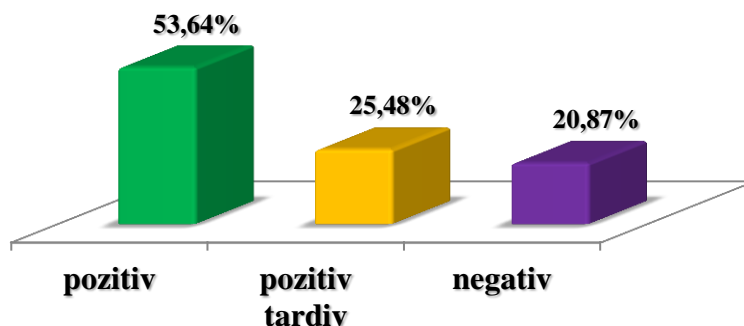


Figura 48. Frecvența producerii catalazei

Producerea **coagulazei legate (clumping factor)** a fost urmărită la un număr de 100 de tulpini, de stafilococi, cu ajutorul kiturilor de diagnostic. În cazul kitului **Staphylo Rapid Test**, aglutinările apar în primele 60 de secunde, reacția fiind considerată pozitivă, iar în cazul kitului **Staph Latex**, aglutinările apar în primele două minute, reacția fiind considerată pozitivă.

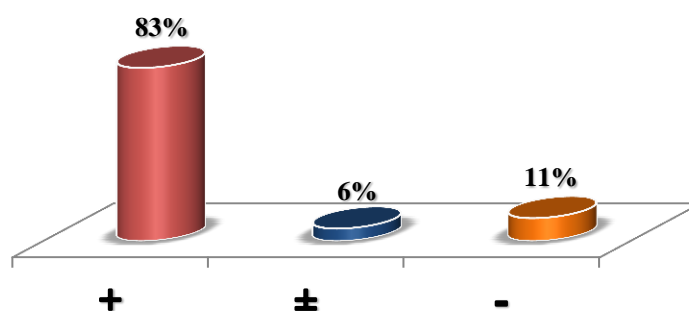


Figura 49. Frecvența tulpinilor care au produs coagulază legată

4.2.1.3. Rezultatele obținute privind rezistența la novobiocin și furazolidon

Din analiza datelor obținute, rezultă că 11 tulpini de stafilococi (2,66%) au fost rezistente față de **novobiocin**, aspect fenotipic care sugerează încadrarea lor în speciile de stafilococi coagulază negativi și manită pozitivi sau pot fi tulpini de stafilococii saprofiți.

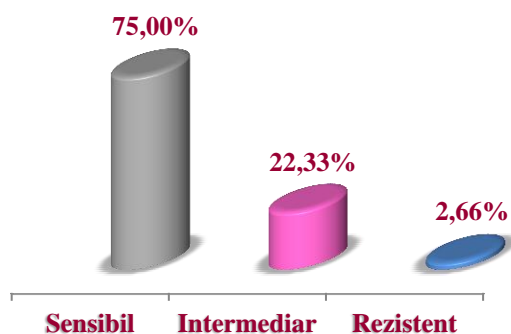


Figura 52. Frecvența tulpinilor sensibile față de novobiocin

Din analiza rezultatelor obținute, rezultă că 27 de tulpini (6,55%), din tulpinile supuse testării, au fost rezistente față de **furazolidon**, probabil ca urmare a apariției unor mutante rezistente la acest chimioterapic, care au apărut fie spontan, fie ca urmare a unor tratamente efectuate cu substanțe antimicrobiene din aceeași grupă.

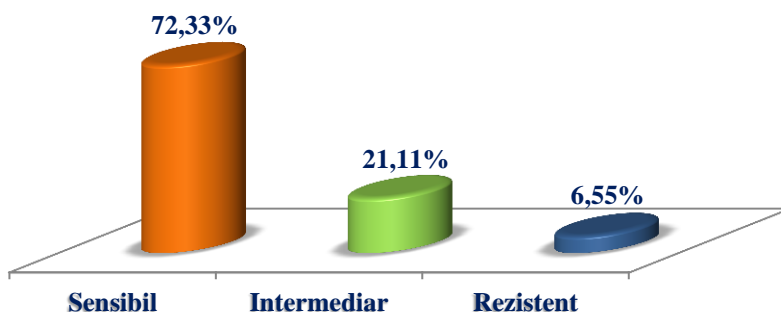


Figura 53. Frecvența tulpinilor sensibile față de furazolidon

4.2.2. Discuția rezultatelor obținute privind identificarea preliminară

Pe baza **rezultatelor obținute**, în cadrul cercetărilor proprii, putem recomanda o schemă de identificare preliminară privind infecțiile stafilococice la animale, care permite:

- ✓ încadrarea tulpinilor izolate în cadrul genului *Staphylococcus*;
- ✓ încadrarea tulpinilor izolate în cadrul celor două grupe, respectiv stafilococi coagulază pozitivi și stafilococi coagulază negativi;
- ✓ discriminarea speciei *S. aureus subsp. aureus* față de alte specii de stafilococi;
- ✓ discriminarea tulpinilor care produc biofilm.

Aceste obiective pot fi realizate folosind următoarele etape:

- obținerea culturilor primare în apă peptonată;

- utilizarea mediului Chapman pentru inhibarea speciilor bacteriene non-halotolerante și pentru discriminarea tulpinilor de stafilococi manită pozitivi față de tulpinile de stafilococi manită negativi;
- testarea activității hemolitice și a pigmentogenezei pe agar cu sânge defibrinat de oaie 7%;
- evidențierea catalazei, utilizând testul în tuburi;
- evidențierea elaborării coagulazei libere pe mediul Baird-Parker;
- discriminarea tulpinilor aparținând speciei *S. aureus subsp. aureus* pe mediul Chromatic™ Staph aureus, precum și a tulpinilor aparținând speciilor *S. sciuri* și *S. xylosus*;
- discriminarea tulpinilor care produc biofilm pe mediul cu roșu de Congo.

4.2.3. Rezultatele obținute și discuția privind identificarea definitivă

4.2.3.1. Rezultatele obținute privind identificarea definitivă cu sistemul API Staph

Pe baza rezultatelor, furnizate de acest sistem multitest, au fost identificate definitiv 13 specii de stafilococi, dintre care două specii au fost coagulază pozitive (*S. aureus subsp. aureus*, *S. hyicus*) și 11 specii au fost coagulază negative (*S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. homnins*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*).

Acest sistem nu are în tabelul de identificare speciile *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. fleurettii* și *S. devriesei*. Programul API web, pe baza caracterelor biochimice, poate notifica următorul mesaj: “Possibility of *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. fleurettii* or *S. devriesei* of Veterinary Origin”. În aceste situații, programul API web poate indica unele caractere biochimice care să fie testate suplimentar și totodată care teste adiționale trebuie efectuate pentru încadrarea definitivă a tulpinilor.

4.2.3.2. Rezultatele obținute privind identificarea biochimică

Au fost supuse identificării definitive, pe baza proprietăților glucidolitice, un număr de 348 tulpini de stafilococi, izolate de la mai multe specii de animale.

Rezultatele obținute, în urma identificării definitive, prin tipizarea biochimică, relevă că, din probele de material patologic, prelevate de la mai multe specii de animale, au fost izolate un număr de 14 specii, a căror frecvență a fost cuprinsă între 0,28% și 27,58%, ceea mai mare frecvență având-o *S. aureus subsp. aureus*, fiind urmată de *S. xylosus*, *S. sciuri* și *S. intermedius* (figura 55). De asemenea, tot din aceste date, rezultă că speciile de stafilococi coagulază pozitivi au avut o frecvență cuprinsă între 1,14% și 27,58%, iar speciile de stafilococi coagulază negativi au avut o frecvență cuprinsă 0,28% și 16,37%.

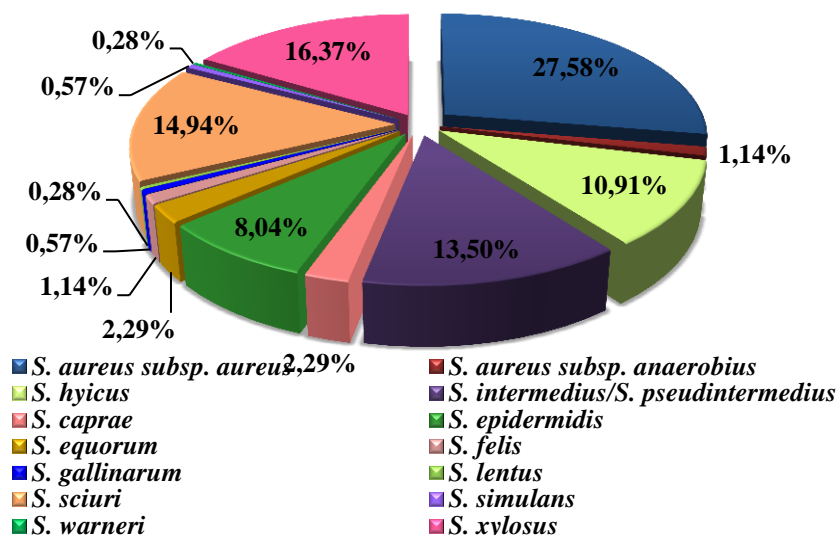


Figura 55. Frecvența speciilor de stafilococi identificate biochimic

Rezultatele obținute, în cadrul cercetărilor proprii, care fac obiectul acestui capitol, au fost finalizate printr-un număr de 33 de concluzii.

CAPITOLUL 5. CARACTERIZAREA GENOTIPICĂ A TULPINILOR DE STAFILOCOCI

În cadrul acestui capitol au fost efectuate cercetări de biologie moleculară care au urmărit trei obiective:

- ✓ prezența genei *mec* la tulpinile de stafilococi meticilin rezistente;
- ✓ diferențierea tulpinilor de *S. intermedius* de tulpinile de *S. pseudintermedius*;
- ✓ identificarea clonală a tulpinilor de *S. intermedius/S. pseudintermedius* izolate de la câini și pisici.

5.1. MATERIALE ȘI METODE

5.1.1. Detecția genei *mec*

Prezența genei *mecA1* și a genei *mecA2* a fost urmărită prin tehnica PCR la un număr de 50 tulpini de stafilococi meticilin rezistente izolate de la mai multe specii de animale. Tulpinile supuse acestui test au fost încadrate în următoarele specii: *S. aureus subsp. aureus* (20 tulpini), *S. hyicus* (7 tulpini), *S. intermedius/S. pseudintermedius* (5 tulpini), *S. epidermidis* (5 tulpini), *S. sciuri* (8 tulpini) și *S. xylosus* (5 tulpini).

5.1.2. Diferențierea speciei *S. intermedius* de *S. pseudintermedius*

Au fost supuse tehnicii PCR, pentru diferențiere, între aceste două specii, un număr de 25 de tulpini izolate de la câini și pisici care, pe baza caracterelor fenotipice, au fost încadrate în specia *S. intermedius*. Având în vedere faptul că, în ultimii ani, este dominantă specia *S. pseudintermedius* și că aceste două specii nu pot fi diferențiate fenotipic, în cadrul acestor cercetări, discriminarea, între aceste specii, a fost făcută prin tehnica de biologie moleculară amintită.

5.1.3. Amprentarea genetică prin amplificare arbitrară - RAPD

Pentru identificarea clonală, a tulpinilor de *S. intermedius*/*S. pseudintermedius* (34 tulpini), izolate de la câini și pisici, a fost utilizat testul de biologie moleculară denumit Amprentarea genetică prin amplificare arbitrară.

5.2. REZULTATELE OBTINUTE

5.2.1. Rezultate și discuții privind prezența genele *mecA1* și *mecA2*

Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor, privind detecția genelor *mecA1* și *mecA2*, sunt redate în tabelul 29. Analiza acestor rezultate evidențiază prezența genelor *mecA1* și *mecA2* la 39 tulpini, reprezentând 78% din tulpinile supuse testării.

Tabelul 29

Rezultatele tehnicii duplex PCR

Nr. crt.	Specia	Rezultatul		TOTAL
		+	-	
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	18	2	20
2.	<i>S. epidermidis</i>	1	4	5
3.	<i>S. hyicus</i>	7	0	7
4.	<i>S. xylosus</i>	4	1	5
5.	<i>S. intermedius/pseudintermedius</i>	4	1	5
6.	<i>S. sciuri</i>	5	3	8
TOTAL		39	11	50

5.2.2. Rezultate și discuții privind diferențierea speciilor *S. intermedius* și *S. pseudintermedius*

Pentru diferențierea genotipică au fost supuse testării 25 tulpini de stafilococi, din care 22 tulpini au fost izolate de la câini și 3 tulpini au fost izolate de la pisici.

Cu ajutorul acestei tehnici de biologie moleculară și prin utilizarea a doi primeri specifici, 9 tulpini, respectiv 36%, au fost incluse în specia *S. intermedius*, 6 tulpini fiind izolate de la câini și 3 tulpini fiind izolate de la pisici, iar 16 tulpini, respectiv 64%, au fost incluse în specia *S. pseudintermedius*, toate fiind izolate numai de la câini.

5.2.3. Rezultate și discuții privind amprentarea genetică prin amplificare arbitrară – RAPD

Prin această tehnică, de biologie moleculară, au fost testate 34 tulpini de *S.intermedius/S. pseudintermedius*, respectiv 22 tulpini de origine canină și 12 tulpini de origine felină. Amprentarea genetică, prin această tehnică, a fost realizată cu amorsele P1 și P2, pe molecule de ADN genomic extrase din cele 34 tulpini.

Tulpinile de *S.intermedius/S. pseudintermedius*, izolate de la câini (22 tulpini) sunt îndepărtate filogenetic față de tulpinile de origine felină (12 tulpini), având fiecare propriul cluster, respectiv origini diferite.

Tulpinile de *S.intermedius/S. pseudintermedius*, izolate de la pisici, au amprente genetice similare având aceeași origine, ceea ce demonstrează înrudirea lor filogenetică.

Rezultatele obținute, în cadrul cercetărilor proprii, care fac obiectul acestui capitol, au fost finalizate printr-un număr de 8 de concluzii.

CAPITOLUL 6. CERCETĂRI PRIVIND FRECVENȚA FENOTIPURILOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE LA TULPINILE DE STAFILOCOCI

Antibiorezistența, la bacterii, reprezintă o problemă de mare actualitate în medicina veterinară și umană, deoarece este considerată un fenomen cu risc zoonotic pronunțat. Fenotipurile de rezistență la bacterii patogene pentru animale, inclusiv la stafilococi, au o frecvență în continuă creștere datorită utilizării produselor medicinale veterinare, pe bază de antibiotice, în special la animalele crescute în sistem intensiv.

Cercetările efectuate, în acest capitol, au urmărit stabilirea fenotipică a antibioretistenței, respectiv stabilirea frecvenței fenotipurilor de rezistență la tulpinile de stafilococi izolate de la animale.

6.1. MATERIALE ȘI METODE

Profilul de rezistență la antibiotice a fost determinat prin metoda disc-difuzimetrică (metoda KIRBY-BAUER), folosind, în acest scop, mediul MUELLER-HINTON, biodiscuri cu 20 antibiotice din mai multe grupe și 412 tulpini de stafilococi, care au fost testate, încadrate în 22 de specii.

6.2. REZULTATE OBTINUTE ȘI DISCUȚIA REZULTATELOR

Rezultatele obținute, în forma primară, au fost prelucrate, centralizate și redactate în mai multe tabele și sub formă grafică, în funcție de: antibiotic, specia de animal și speciile de stafilococi izolate.

Rezultatele obținute, în urma studierii fenotipurilor de rezistență, în funcție de **clasele de antibiotice**, care au reprezentat **primul obiectiv**, au fost prelucrate și redactate în tabelul 32.

Tabelul 32

Comportamentul tulpinilor de stafilococi față de antibioticele utilizate

Antibioticul	Concentrația (μg)	Diametrul zonei de inhibiție (mm)			S		I		R		Tulpini testate
		S	I	R	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	
Penicilină G	10	≥37	27-36	≤26	156	37,86	73	17,71	183	44,41	412
Ampicilină	10	≥35	28-34	≤27	169	41,01	100	24,27	143	34,70	412
Ampicilină/Sulbactam	10/10	≥37	30-36	≤29	292	70,87	81	19,66	39	9,46	412
Amoxicilină	30	≥28	22-27	≤21	229	55,58	95	23,05	88	21,35	412
Amoxicilină/Acid clavulanic	20/10	≥36	29-35	≤28	229	55,58	115	27,91	68	16,50	412
Meticilină	5	≥14	10-13	≤9	186	45,14	110	26,69	116	28,15	412
Oxacilină	1	≥20	17-19	≤16	96	23,30	121	29,36	195	47,33	412
Cefoxitin	30	≥29	24-28	≤23	371	90,04	27	6,55	14	3,39	412
Eritromicină	15	≥23	14-22	≤13	124	30,09	56	13,59	232	56,31	412
Clindamicină	2	≥30	25-29	≤24	169	41,01	81	19,66	162	39,32	412
Kanamicină	30	≥26	20-25	≤19	238	57,76	65	15,77	109	26,45	412
Gentamicină	10	≥27	20-26	≤19	240	58,25	100	24,27	72	17,47	412
Tobramicină	10	≥29	20-28	≤19	219	62,93	83	23,85	46	13,21	348
Tetraciclină	30	≥30	25-29	≤24	211	51,21	80	19,41	121	29,36	412
Ciprofloxacină	5	≥30	23-29	≤22	270	77,58	38	10,92	40	11,49	348
Enrofloxacină	5	≥20	17-19	≤16	270	77,58	38	10,92	40	11,49	348
Lincomicină	10	≥15	14-15	≤13	179	43,44	59	14,32	174	42,23	412
Novobiocin	30	≥22	17-21	≤16	309	75	92	22,33	11	2,66	412
Furazolidon	50	≥15	11-14	≤10	298	72,33	87	21,11	27	6,55	412
Rimfampicină	30	≥39	35-38	≤34	49	76,56	12	18,75	3	4,68	64

Analizând rezultatele obținute se observă că, la tulpinile testate, antibiosensibilitatea, antibiorezistența și comportamentul intermediar, față de unul sau mai multe antibiotice, au avut o frecvență variabilă, după cum urmează:

- antibiosensibilitatea a fost cuprinsă între 23,30% (OX) și 90,04% (FOX);
- antibiorezistența a fost cuprinsă între 2,66% (NO) și 56,31% (E);
- comportamentul intermediar a fost cuprins între 6,55% (FOX) și 29,36% (OX).

Al doilea obiectiv urmărit, în cadrul cercetărilor efectuate, în acest capitol, a fost reprezentat de comportamentul tulpinilor de stafilococi, față de antibioticele supuse testării, **în funcție de specia de animale** de la care au fost izolate aceste tulpini.

Rezultatele obținute au evidențiat prezența fenomenului de antibiorezistență la tulpinile de stafilococi coagulază pozitivi și coagulază negativi izolate atât de la animale de rentă, cât și de la animale de companie. Tulpinile de stafilococi cu rezistență multiplă la antibiotice au o frecvență tot mai mare, iar fenotipurile de rezistență, față de antibioticele utilizate în terapie, evidențiază extinderea continuă a acestui fenomen prin intermediul unui circuit epidemiologic complex animal-om, cu două sensuri.

Al treilea obiectiv urmărit, în cadrul acestor cercetări, a fost reprezentat de **frecvența fenotipurilor de rezistență la fiecare specie de stafilococi**. Pentru a urmări frecvența acestor fenotipuri au fost stabilite mai multe intervale, a căror limite au fost exprimate procentual. De asemenea, speciile de stafilococi izolate au fost grupate în funcție de producția de coagulază liberă, respectiv în grupul stafilococilor coagulază pozitivi și grupul stafilococilor coagulază negativi.

Frecvența fenotipurilor de rezistență la stafilococii coagulază pozitivi este redată în tabelul 34. În urma analizei datelor, redate în acest tabel, rezultă câteva observații cu importanță practică privind:

- frecvența fenotipurilor de rezistență;
- numărul fenotipurilor de rezistență;
- semnificația acestora privind utilizarea antibioticelor în terapia unor infecții produse de stafilococi coagulază pozitivi.

Frecvența fenotipurilor de rezistență la stafilococii coagulază negativi, sunt redate în tabelul 35. Datele prezentate, în acest tabel, evidențiază câteva aspecte privind frecvența și numărul fenotipurilor de rezistență identificate la tulpinile de stafilococi aparținând acestor specii.

Tabelul 34

Frecvența fenotipurilor de rezistență la stafilococii coagulază pozitivi

Nr. crt.	Specia de stafilococ	Frecvența și numărul fenotipurilor de rezistență					
		≤10%	10,1-20%	20,1-30%	30,1-40%	40,1-50%	>50%
1.	<i>S. aureus subsp.aureus</i>	14: AMS, AML, AUG, CN, TOB, TE, CD, MY, K, P, AMP, E, CIP, ENR	8: AMP, K, CIP, ENR, P, E, CD, MY	7: P, E, CD, MY, AMP, AML, K	0	0	0
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	1: E	0	0	0	0	0
3.	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	13: P, AMP, AML, E, CD, K, CN, TOB, TE, CIP, ENR, MY, AMS	5: CD, MY, AMP, AUG, E	3: E, TE, P	0	0	0
4.	<i>S. hyicus</i>	2: CIP, ENR	3: AUG, CN, TOB	1: K	3: P, AMP, TE	3: E, CD, MY	0

Tabelul 35

Frecvența fenotipurilor de rezistență la stafilococii coagulază negativi

Nr. crt.	Specia de stafilococ	Frecvența și numărul fenotipurilor de rezistență					
		≤10%	10,1-20%	20,1-30%	30,1-40%	40,1-50%	>50%
1.	<i>S. epidermidis</i>	12: P, AMP, AUG, E, CD, K, CN, TE, CIP, ENR, MY, AML	0	0	0	0	0
2.	<i>S. caprae</i>	5: AMP, AML, AUG, E, K	1: P	0	0	0	0
3.	<i>S. equorum</i>	7: P, AMP, E, K, CN, TOB, MY	0	0	0	0	0
4.	<i>S. felis</i>	4: P, AMP, AUG, MY	0	0	0	0	0
5.	<i>S. gallinarum</i>	1: MY	0	0	0	0	0
6.	<i>S. lentus</i>	0	0	0	0	0	0
7.	<i>S. sciuri</i>	14: P, AMP, E, CD, K, CN, TE, CIP, ENR, MY, AML, AUG, AMS, TOB	8: P, AML, AUG, E, CD, MY, AMP, K	0	0	0	0
8.	<i>S. simulans</i>	2: P, MY	0	0	0	0	0
9.	<i>S. warneri</i>	2: P, MY	0	0	0	0	0
10.	<i>S. xylosus</i>	14: P, AMP, AUG, E, CD, TE, MY, K, CN, TOB, CIP, ENR, AML, AMS	4: P, AML, E, CD	1: CD	1: MY	0	0

Rezultatele obținute, în cadrul cercetărilor proprii, care fac obiectul acestui capitol, au fost finalizate printr-un număr de 27 de concluzii.

CAPITOLUL 7. CERCETĂRI PRIVIND FRECVENȚA TULPINILOR METICILIN REZISTENTE

O atenție deosebită este acordată, în ultimii ani, tulpinilor de stafilococi meticilin rezistente, cunoscute generic sub denumirea de stafilococi MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Aceste tulpini au un risc zoonotic pronunțat și un circuit epidemiologic complex, fiind întâlnite frecvent și la oameni. De asemenea, rezistența la meticilină este asociată cu rezistența multiplă la antibiotice, mai ales cu rezistența față de peniciline, cefalosporine și aztreonam.

Datele existente în literatură demonstrează că meticilin-rezistența este prezentă atât la stafilococii coagulază pozitivi, cât și la stafilococii coagulază negativi. Extinderea meticilin-rezistenței, de la tulpinile de *S. aureus subsp. aureus* la alte specii de stafilococi, este generată de mecanismele de transmitere ale casetei cromozomiale stafilococice *mec* (Staphylococcal Chromosome Cassete *mec*- SCC*mec*), existentă în elementele genetice mobile din citoplasma stafilococilor.

7.1. MATERIALE ȘI METODE

Frecvența tulpinilor meticilin rezistente a fost urmărită la un număr de 412 tulpini de stafilococi, încadrate în 22 de specii. Frecvența tulpinilor meticilin rezistente a fost stabilită fenotipic prin două teste și confirmată la un număr de 50 tulpini prin reacția polimerazică în lanț.

Frecvența tulpinilor meticilin rezistente a fost stabilită fenotipic prin **metoda disc-difuzimetrică** (Kirby-Bauer), utilizând biodiscuri cu meticilină (5 μg), oxacilină (1 μg) și cefoxitin (30 μg).

Un număr de 210 tulpini de stafilococi coagulază pozitivi și coagulază negativi au fost selecționate, pentru a fi pasate pe **mediul Chromatic MRSA**, după următoarele criterii:

- au manifestat rezistență fenotipică față de cel puțin unul din cele trei antibiotice amintite;
- au avut comportament intermediar la cel puțin două din cele trei antibiotice.

7.2. REZULTATE OBȚINUTE

Rezultatele obținute, prezentate figura 87, redau frecvența tulpinilor meticilin rezistente, detectate prin metoda disc-difuzimetrică, din totalul tulpinilor de stafilococi supuse testării și în funcție de specia de animale.

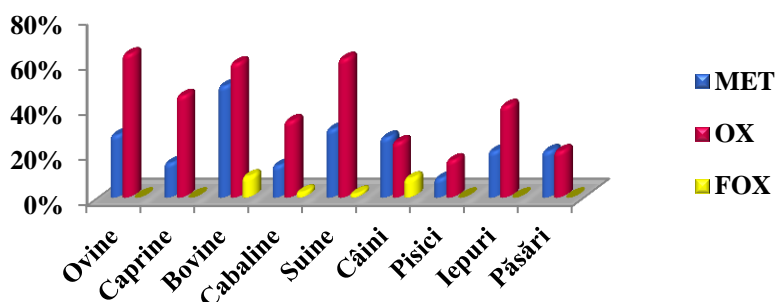


Figura 87. Frecvența tulpinilor de stafilococi rezistenți la MET, OX, FOX

Pe mediul Chromatic MRSA, care este un mediu cromogen selectiv, tulpinile de *S. aureus subsp. aureus*, rezistente la cel puțin unul din cele trei antibiotice, au format colonii colorate mov sau portocaliu, de diferite nuanțe (figura 36), iar tulpinile de stafilococi „non-*S. aureus*”, rezistente la cel puțin unul din cele trei antibiotice au format colonii albe sau albastre. Rezultatele obținute, pe acest mediu cromogen, sunt redată în tabelul 37.

Tabelul 37

Rezultatele obținute pe mediul Chromatic MRSA

Nr. crt.	Specia de stafilococ	Nr. tulpini	Chromatic MRSA		Rezultatul final
			mov/portocaliu	alb/albastru/-	
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	63	63	-	MRSA
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	3	1	2	MRSA
3.	<i>S. hyicus</i>	31	-	31	MRSH
4.	<i>S. intermedius/ S. pseudintermedius</i>	21	-	21	MRSI
5.	<i>S. caprae</i>	5	-	5	MRSC
6.	<i>S. epidermidis</i>	15	-	15	MRSEP
7.	<i>S. equorum</i>	5	-	5	MRSE
8.	<i>S. lentus</i>	1	-	1	MRSL
9.	<i>S. sciuri</i>	30	-	30	MRSS
10.	<i>S. xylosus</i>	36	-	36	MRSX
TOTAL		210	64	152	

Tot în cadrul cercetărilor efectuate a fost urmărită și frecvența tulpinilor rezistenți la MET, OX și FOX, în funcție de specia de stafilococi, iar rezultatele obținute sunt redată în tabelul 38.

Rezistența speciilor de stafilococi la cele trei beta-lactamine

Nr. crt.	Specia de stafilococ	Nr. tulpini rezistente						TOTAL	
		MET		OX		FOX		Nr.	%
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%		
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	31	30,39	50	49,01	1	0,98	82	80,39
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	0	0	2	50	0	0	2	50
3.	<i>S. hyicus</i>	13	32,5	26	65	1	2,5	40	100
4.	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	9	17,64	11	21,56	3	5,88	23	45,09
5.	<i>S. caprae</i>	0	0	5	62,5	0	0	5	62,5
6.	<i>S. epidermidis</i>	5	15,62	11	34,37	0	0	16	50
7.	<i>S. equorum</i>	2	20	4	40	0	0	6	60
8.	<i>S. felis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	<i>S. gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	<i>S. lentus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	<i>S. sciuri</i>	11	19,29	25	43,85	2	3,50	38	66,66
12.	<i>S. simulans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
13.	<i>S. warneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	<i>S. xylosus</i>	8	12,69	25	39,68	2	3,17	35	55,55

7.3. DISCUȚIA REZULTATELOR

Analizând rezultatele obținute, prin utilizarea tehnicii disc-difuzimetrice, se observă că frecvența tulpinilor de stafilococi rezistenți la aceste trei beta-lactamine a fost diferită, după cum urmează:

- frecvența tulpinilor rezistenți la meticilină a fost de 1,68 ori mai mică decât frecvența tulpinilor rezistenți la oxacilină;
- frecvența tulpinilor rezistenți la meticilină a fost de de 8,3 ori mai mare decât frecvența tulpinilor rezistenți la cefoxitin;
- frecvența tulpinilor rezistenți la oxacilină a fost de 13,96 ori mai mare decât frecvența tulpinilor rezistenți la cefoxitin.

Rezultatele obținute, în cadrul cercetărilor proprii, care fac obiectul acestui capitol, au fost finalizate printr-un număr de 14 concluzii.

CAPITOLUL 8. CONCLUZII GENERALE

Cercetările care fac obiectul tezei de doctorat sunt finalizate printr-un număr de 47 de concluzii generale cu importanță științifică și practică, completând, astfel, datele existente, în țara noastră, privind studiul fenotipic și genotipic al tulpinilor de stafilococi coagulază pozitivi și coagulază negativi izolați de la animale de rentă și de companie.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC STUDY OF STAPHYLOCOCCI STRAINS ISOLATED FROM ANIMALS

ABSTRACT

Staphylococci are Gram positive bacteria, considered as ubiquitous, which have skin and mucous habitat in both animals and humans. These bacteria are present in the external environment and in the micromedium, having, as a substrate, the soil, water, air, bedding, facilities and utensils in the shelters, inventory in veterinary and hospital clinics, utensils and installations in plants processing animal products, and also food of animal origin intended for human consumption. These substrates represent reservoirs and secondary sources of infection for animals and humans.

In recent years, several species of negative coagulase staphylococci (SCN) have been isolated from animals and humans, which can produce localized infections in both animals and humans, most notably nosocomial infections.

Staphylococci manifests a pronounced aggression for tissues and organs, based on the existence of pathogenicity attributes, represented by virulence, toxicity and biofilm formation. These pathogenicity factors are genetically encoded, having the respective genes present in the chromosome and in the mobile genetic elements existing in the cytoplasm.

Staphylococci are considered to be zoonotic-risk bacteria, animals being an important infection reservoir for humans, with a complex epidemiological circuit, both between livestock and humans, and between pets and humans, however staphylococci can also move from people to animals.

Multiple resistance to antibiotics, in staphylococci, is considered a pronounced zoonotic risk factor, because staphylococcal resistance phenotypes have a steadily increasing rate in both livestock and pets and the strains presenting this phenomenon have a complex epidemiological circuit. These phenotypes present in staphylococcus strains, isolated from animals, are permanently monitored because, based on them, therapeutic conduct is established and the strain circuit is followed.

Resistance to methicillin was reported, initially, to *S. aureus subsp. aureus* and then to other species and the resistant strains to this antibiotic were called MRSA strains (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Extending the methicillin resistance phenomenon led to numerous studies, as these strains have also reached to humans, therefore considered strains with zoonotic risk. Resistance to methicillin occurs as a result of penicillin binding proteins intervention, whose synthesis is encoded by the SCC_{mec} cassette. For the detection of methicillin resistance, oxacillin has been proposed since 2004, and ceftiofur since 2005, because the results obtained with these two beta-lactamases are much more reliable.

The Ph D thesis contains 284 pages, 38 tables and 87 figures, which includes 52 original images and 35 graphics. The scientific support of the thesis is represented by 300 bibliographic titles, including scientific papers, papers, doctoral thesis and web pages.

The doctoral thesis is structured in two parts, namely "Bibliographic research", included in Part I and "Own research", included in Part II.

Part I

BIBLIOGRAPHICAL RESEARCH

The first part of the thesis is a bibliographic study, structured in two chapters and extended to 74 pages (26,06%). In this part, there are 3 tables and 3 representative figures along with current data on the *Staphylococcus* genus.

CHAPTER 1. THE STAPHYLOCOCCACEAE FAMILY. THE STAPHYLOCOCCUS GENUS

The first chapter is a synthesis of data from the literature, rigorously selected on systematics of *Staphylococcus* genus. The taxonomy of this genus, taken from www.bacterio.net/allnamesz.html, which includes the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, is coordinated by Prof. Dr. EUSZÉBY J. P.

Within the chapter, the latest data on ecology, morphology, antigenic structure and pathogenic factors are presented. Also, the chapter includes current data on the genetics of these bacteria, multiple antibiotic resistance and the phenomenon of methicillin resistance. It is also presented the pathogenic staphylococci species to livestock and pets and the morbid entities products.

CHAPTER 2. LABORATORY DIAGNOSIS OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS IN ANIMALS

This chapter presents an extensive bibliographic synthesis on the diagnosis of staphylococcal infections in animals. Techniques of sampling, pathological materials, as well as their transport are presented. Particular attention is given to the bacteriological examination, regarding both primary and definitive identification, as well as culture media, current tests and commercial systems. It is also presented the clonal identification, toxin detection and molecular biology tests used in recent years.

Part II

OWN RESEARCH

Part II includes its own research and it's structured in 6 chapters (3-8), extended to 210 pages (73.94%). This part of the thesis is illustrated by 35 tables and 84 figures, including 49 original images and 35 graphs.

CAPITOLUL 3. GOAL, MOTIVATION AND RESEARCH OBJECTIVES

Staphylococci are pathogenic, conditioned pathogenic and opportunistic pathogenic bacteria depending on the species and the presence of favorable factors. They have tropism for skin and mucous membranes, producing localized suppurative infections, septicemia and infectious entity, well-contoured, that evolve in animals and humans, generically called staphylococci. In some situations, they may also act as secondary pathogens, mainly after some viroses.

Staphylococci evolve in animals as distinct epidemiological and anatomoclinic, with septic and/or localized evolution. Of these, the infectious mastitis of dairy cows is distinguished as the frequency, economic and health importance.

Depending on the pathogenicity of the staphylococci species and the clinical evolution of the produced entities, most researchers distinguish between *S. aureus subsp. aureus*, the type species of the genus, considered the most pathogenic species and other species of coagulase positive and negative staphylococci, included in a group generically called "non-*S. aureus* " staphylococci.

Pathogenicity mechanisms are carried out in a complex sequence, involving extracellular enzymes and toxins, which act as rings in a biochemical reaction, and less as individualized form. Staphylococci penetrate the body into the skin and mucous membranes through sebaceous glands, sweat glands, hair follicles, microlesions and larger lesions. Incipient (locally) infectious process is the consequence of strain number, virulence and toxicity, and the ability of local defense mechanisms, of host organisms, that interact through phagocytosis, mainly through the neutrophil granulocytes mobilized and potentiated by opsonization and through lysis by the complement system. Repeated staphylococcal infections in the skin may trigger a hypersensitivity or allergy to some staphylococcal antigens.

Studies showed that antibiotic resistance is genetically determined, with the support of many resistance genes located in the bacterial chromosome, plasmids R, intergongs and transposons, which are mobile genetic elements. Through these, genes encoding the antibiotic resistance can be transferred between strains of the same bacterial species (intraspecific transmission) as well as between strains belonging to other bacterial species (interspecific transmission). Also, the research showed that R-plasmids are the main factors of extracromosomal resistance to antibiotics, especially

those of the conjugate type that contain 3 groups of genes, namely transfer control genes, genes encoding autoreplication, and genes encoding resistance to antibiotics. These genes have been detected and studied using molecular biology techniques, the most widely used PCR technique, in several variants.

Numerous research teams undertake extensive screening studies to monitor the epidemiological circuit of resistant methicillin strains, using both classical phenotypical techniques and molecular biology methods that are faster and allow the detection of *SCCmec*, which encodes resistance to this antibiotic.

Taking into consideration the above mentioned aspects, the following objectives were pursued in the research underlying the PhD thesis:

- ✓ cultural, morphological and tinctorial study of staphylococci isolates;
- ✓ the study of the biochemical profile, using a multitest system and based on glucidolytic activity;
- ✓ the use of chromogenic media to discriminate strains of *S. aureus subsp. aureus* and MRSA strains;
- ✓ establishing the frequency of some staphylococci species isolated from animals;
- ✓ the study of existing pathogenicity factors in the isolated strains;
- ✓ simplifying the isolation and primary typing scheme of isolated strains;
- ✓ investigating the presence of free coagulation as a pathogenic factor and differentiation of the strains in the two groups;
- ✓ studying the resistance phenotypes (patterns) of the isolated strains;
- ✓ studying the phenomenon of methicillin resistance at the isolated strains;
- ✓ the detection of *mec* gene in methicillin-resistant staphylococci strains, using the PCR technique;
- ✓ the differentiation of *S. intermedius* strains from *S. pseudintermedius* strains using PCR technique;
- ✓ clonal identification of *S. intermedius/S. pseudintermedius* strains isolated from dogs and cats.

CHAPTER 4. ISOLATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF STAPHYLOCOCCI STRAINS

In animals and humans, staphylococci produce various localized infections or infectious diseases, that are well-rounded, with economic and health importance. In recent years, the role of negative coagulase staphylococci (NCS) in the etiology of localized infections has increased, of which stand out the subclinical mastitis in dairy cows or various cutaneous infections or with localization in

some organs in swine and pets. These bacteria have tropism for epithelial (skin and mucous), but due to the aggressive equipment they possess, represented by the enzymes, toxins and other pathogenic factors, they can invade any tissue or organ. Natural infections in humans and animals are influenced by several factors related to host organisms, the existence of favorable factors and staphylococci species.

The research underlying this chapter has as main objective the phenotypic characterization of staphylococci strains isolated from healthy and with different localized or generalized infections animals from livestock and pets.

4.1. MATERIALS AND METHODS

Samples of pathological material were taken from several animal species that will be subjected to the bacteriological examination, performed according to the staphylococcal isolation and typing methodology.

4.1.1. Sampling, transporting and insemination of samples

Pathological samples were collected from livestock and companion animals of several species and age categories, with different conditions, or clinically healthy (Table 4).

Sterile swabs were used to collect samples from the **skin**, **nasal secretions** were also taken with sterile swabs, and **uterovaginal secretions** were taken with sterile cotton wipes fixed on a longer plastic rod.

Mastic milk samples were sterile collected, from a number of 22 primiparous cows, where subclinical mastitis begun and evolved 45-60 days after calving, affecting one, two or even three quarters of the mammary gland, while from sheep and goats with gangrenous mastitis, the **mastitic pathological** samples were collected in sterile vials.

Primary sowings were performed in nutrient broth or peptone water, depending on the pathological material that was taken. Subsequently, the tubes with these media were placed on the thermostat for 18-20 hours at 37°C to obtain the **primary cultures**. Gram stained smears were made from these cultures and inseminations were made on the special media intended for the isolation and typing of staphylococcus strains.

Table 4

Samples collected from animals

No. crt.	Species	Age category	No. of collected samples	No. of sterile samples	No. of positive samples	
					No.	%
1.	Sheeps	lambs	22	1	21	-
		adults	54	5	49	-
		Total	76	6	70	17,5
2.	Goats	adults	30	3	27	6,75
		calves	13	0	13	-
3.	Bovines	adults	15	2	13	-
		subclinical mastitis	52	0	52	-
		Total	80	2	78	19,5
4.	Horses	foals	10	0	10	-
		young horses	10	0	10	-
		mares mothers	12	0	12	-
		adults	20	1	19	-
		Total	52	1	51	12,75
5.	Swine	piglets	26	3	23	-
		sows	27	0	27	-
		fattening pigs	26	2	24	-
		Total	79	5	74	18,5
6.	Dogs	adults	55	5	50	12,5
7.	Cats	adults	28	3	25	6,25
		bunnies	11	4	7	-
8.	Rabitts	Female rabitts	4	1	3	-
		adults	5	0	5	-
		Total	20	5	15	3,75
9.	Birds	adults	10	0	10	2,5
TOTAL			430	30	400	100

4.1.2. The used culture media

For the primary isolation of staphylococci strains from the collected pathological materials and subsequently for the phenotypic characterization of staphylococci strains, classic and special media were used, which revealed several biochemical properties of these bacteria, on which the minimal identification was made, followed by the definitive typing of the isolated strains.

The media used were: peptone water, simple broth, Mueller Hinton agar, Chapman medium, 7% sheep defibrinated blood agar, Baird-Parker medium, Chromatic Staph medium, Chromatic MRSA medium, Congo red medium, bromothymol blue peptone water and standard nutrient agar.

4.1.3. API Staph system

Identification to species level of staphylococci strains (64 strains), isolated from mastitic milk samples, collected only from primiparous with subclinical mastitis was made by using the **API Staph** microtest and the **Apiweb** interpretation software.

4.1.4. Catalase test

Hydrogen peroxide, a 3% solution, was used to demonstrate the presence of catalase, which was added in staphylococci cultures tubes in an amount of 1 ml and after that the cultures were examined for 5-10 minutes for gas bubbles.

4.1.5. Free and bound coagulase tests

Diffusible **free coagulase** was highlighted by lyophilised rabbit plasma tubes test and Baird-Parker medium, and **bound coagulase**, also called clumping factor, was highlighted with the Staphylo Rapid Test and Staph Latex kit.

4.1.6. Bacterioscopic and cultural examination

Cultural examination. Cultures obtained after primary inseminations and after inseminations on the mentioned media were examined with the naked eye and the stereoscopic glass, appreciating the following characteristics: turbidity on liquid media, shape, size, pigmentation and coloring on the solid used media, presented above.

Bacterioscopic examination. Gram stained smears were performed from isolated, characteristic colonies in order to emphasize morphological and tinctorial characters.

4.1.7. Furazolidone and novobiocin resistance testing

Novobiocin susceptibility test was performed to differentiate some negative coagulase staphylococci species from positive coagulase staphylococci species.

The furazolidone susceptibility test was used to differentiate staphylococci strains from micrococci strains. The principle of this test is that staphylococci are susceptible to bacteriostatic compounds from the furans class, while the micrococci are resistant.

4.2. THE OBTAINED RESULTS

4.2.1. The results regarding the preliminary identification

4.2.1.1. Cultural and bacterioscopic examination results

In **peptone water**, primary cultures produced variable turbidity, some cultures also producing a non-characteristic, easy homogenisable deposit, while in the **broth**, the primary cultures produced intense turbidity with a non-characteristic deposit, easily homogenizable, and some strains formed a discrete ring on the surface.

On the **Chapman medium**, the positive mannitol strains grew well, fermented the mannite, producing the pH indicator coloration, and the negative mannitol strains grew but did not ferment the mannite and the pH indicator did not turn the color. In some strains, the mannitol fermentation was delayed, respectively at 48 hours.

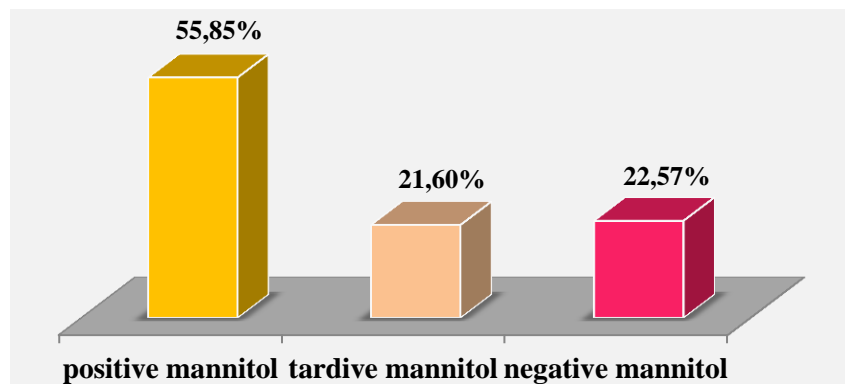


Figure 45. Frequency of staphylococci strains regarding mannitol fermentation

On the **7% sheep defibrinated blood agar**, the strains formed round, curved and non-uniform colonies with a diameter of 1-6 mm, some colonies were opaque and others were creamy.

Pigmentogenesis of colonies was different, depending on the species of staphylococci, the colonies being pigmented in yellow-orange, yellow-gold, yellow-pale or white.

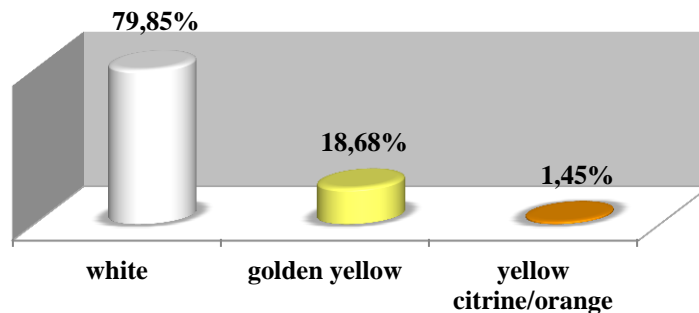


Figure 47. Frequency of pigment types

On this medium has also been determined the type of **hemolysis**, thus, some strains produced total haemolysis in the form of a circular zone around the colonies (**type β hemolysis**), while other strains produced a zone of incomplete haemolysis, **type "hot -cold"** and other strains were **non-hemolytic**.

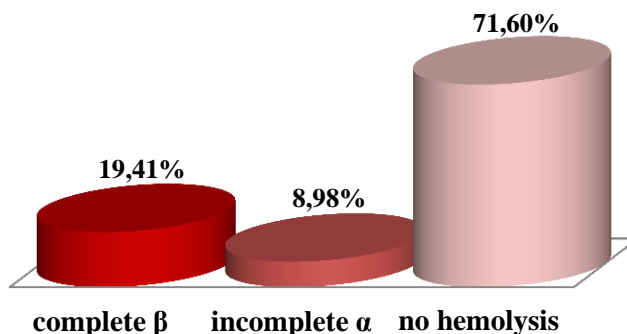


Figure 46. Frequency of hemolysis types

On **Baird-Parker** medium, 412 strains of staphylococci, isolated from animals, were tested. After a 24 hour incubation at 37°C, strains that synthesized the free coagulase formed medium-sized, brilliant black colonies, surrounded by a clear halo. Strains of staphylococci that didn't synthesize free coagulase, did not produce these characteristic changes and formed brilliant black colonies without halos around.

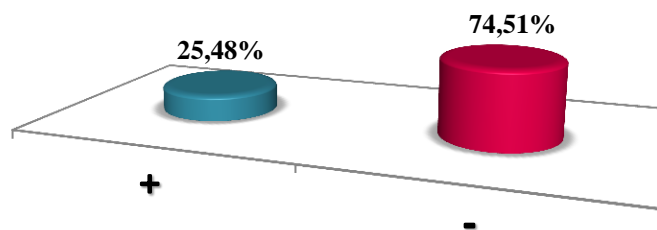


Figure 51. Frequency of coagulase positive and negative strains on Baird-Parker medium

Chromatic™ Staph aureus medium is a selective chromogenic medium for the rapid identification of *S. aureus subsp. aureus*, which form pink-purple colonies, while other species of staphylococci form colonies with different shades of green and blue.

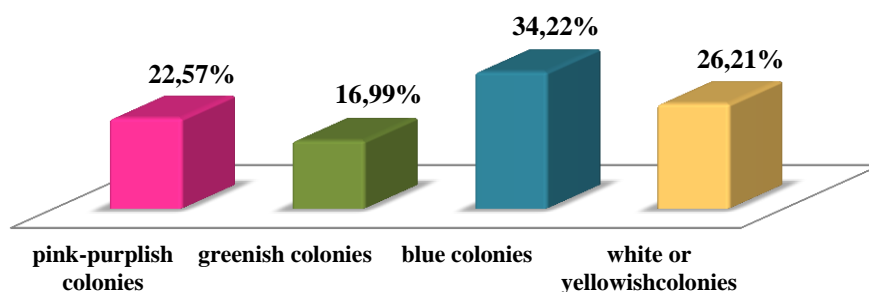


Figure 54. Frequency of colonies types on Chromatic™ Staph aureus medium

Chromatic™ MRSA medium. Strains of *S. aureus subsp. aureus* resistant to at least one of the three antibiotics (MET, OX, FOX) formed purple or orange colonies with different shades, and the „non-*S. aureus*” staphylococci strains resistant to one of the three antibiotics formed white or blue colonies.

On **Red Congo medium**, strains of *S. aureus subsp. aureus*, which have the ability to produce biofilm, form black colonies, while strains of *S. aureus subsp. aureus* that do not produce biofilm, form red or white colonies. Thus, the 35 tested strains have formed red or white colonies, suggesting that they were not biofilm producers.

4.2.1.2. The results obtained regarding the catalase and coagulase presence

For **catalase** production, variant 1, respectively whole broth cultures was used, in which the 3% hydrogen peroxide solution was introduced and after that the cultures were examined for evidence of gas bubbles.

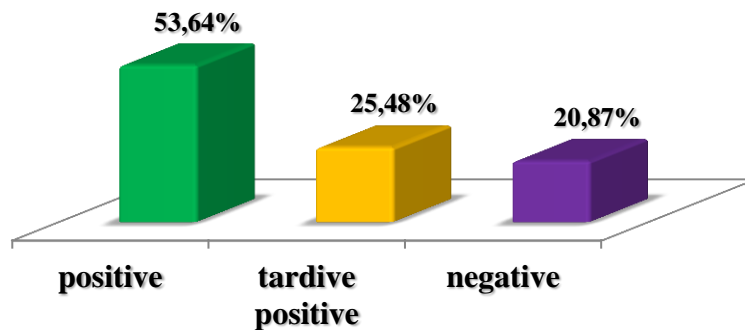


Figure 48. Frequency of catalase production

The production of **clumping factor** was followed at 100 strains of staphylococci using diagnostic kits. For the **Staphylo Rapid Test** kit, agglutination occurs within the first 60 seconds, this reaction being considered positive, while in the case of the **Staph Latex** kit, the reaction, where agglutination occurs within the first two minutes, is considered positive.

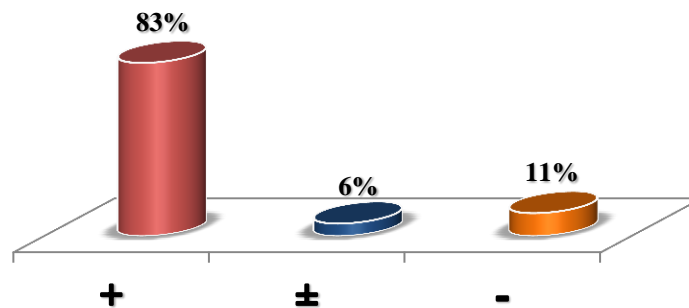


Figure 49. Frequency of strains that produced clumping factor

4.2.1.3. The results obtained regarding the resistance to novobiocin and furazolidone

From the analysis of the data obtained, 11 staphylococci (2,66%) were resistant to **novobiocin**, a phenotypic aspect suggesting their inclusion in the negative coagulase and positive mannitol strains species or the saprophytes staphylococci strains.

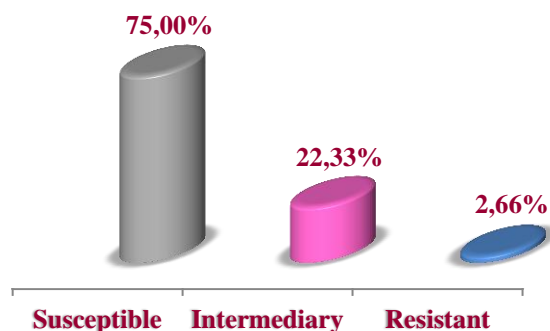


Figure 52. Frequency of susceptible strains to novobiocin

From the analysis of the results, 27 strains (6,55%) of the tested strains were resistant to **furazolidone**, probably due to the appearance of mutant resistance to this chemotherapy, which occurred either spontaneously or as a result of some treatments with antimicrobial agents from the same group.

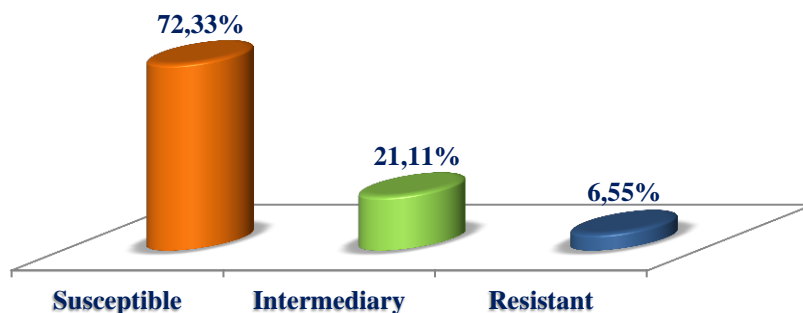


Figure 53. Frequency of susceptible strains to furazolidone

4.2.2. The discussion on the preliminary identification results

Based on the **obtained results** in our own research, we can recommend a preliminary identification scheme for staphylococcal infections in animals that allows:

- ✓ including the isolated strains within the *Staphylococcus* genus;
- ✓ including the isolated strains within the two groups, positive coagulase staphylococci and negative coagulase staphylococci;
- ✓ discrimination of *S. aureus subsp. aureus* versus other species of staphylococci;
- ✓ discrimination of strains producing biofilm.

These objectives can be realized by the following steps:

- obtaining primary cultures in peptone water;

- use of Chapman medium for the inhibition of non- halotolerant bacterial species and for the discrimination of positive mannitol staphylococci strains against negative mannitol staphylococci strains;
- testing of hemolytic activity and pigmentogenesis on 7% sheep defibrinated blood agar;
- highlighting the catalase using the tube test;
- highlighting the elaboration;
- discrimination of strains included in *S. aureus subsp. aureus* species on Chromatic™ Staph aureus medium, as well as strains included in *S. sciuri* and *S. xylosus* species;
- discrimination of strains that produce biofilm on the Red Congo medium.

4.2.3. The results and discussion regarding the final identification

4.2.3.1. The results regarding the final identification with API Staph system

Based on the results provided by this multitest system, 13 species of staphylococci were definitively identified, of which two were positive coagulase species (*S. aureus subsp. aureus*, *S. hyicus*) and 11 species were negative coagulase (*S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. homnins*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*).

This system does not have *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. fleurettii* and *S. devriesei* species in the identification table. The API web program, based on biochemical characters, can notify the following message: “Possibility of *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. fleurettii* or *S. devriesei* of Veterinary Origin”. In these situations, the API web program may indicate some biochemical characters to be tested further, and also which additional tests should be performed for the definitive classification of the strains.

4.2.3.2. The results regarding the biochemical identification

Based on their glucidolytic properties, 348 strains of staphylococci isolated from several animal species were definitive identified.

The results obtained after definitive identification by biochemical typing show that from the samples of pathological material taken from several animal species, 14 species were isolated, with the frequency between 0,28% and 27,58%, from which the highest was from *S. aureus subsp. aureus*, followed by *S. xylosus*, *S. sciuri* and *S. intermedius* (figure 55). Also, all of these data show that positive coagulase staphylococci species had a frequency between 1,14% and 27,58% and coagulase negative species had a frequency between 0,28% and 16,37 %.

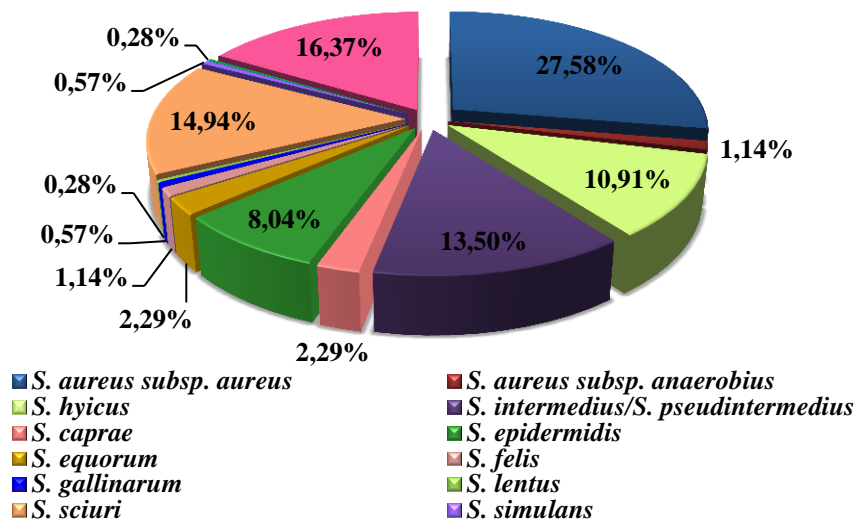


Figure 55. Frequency of staphylococcal species biochemically identified

The results achieved in its own research, which are the subject of this chapter, were finalized by a total of 33 conclusions.

CHAPTER 5. GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF STAPHYLOCOCCI STRAINS

Within this chapter, molecular biology researches were conducted, which aimed three objectives:

- ✓ presence of the *mec* gene in methicillin resistant strains of staphylococci;
- ✓ differentiation of *S. intermedius* strains by *S. pseudintermedius* strains;
- ✓ clonal identification of *S. intermedius/S. pseudintermedius* strains isolated from dogs and cats.

5.1. MATERIALS AND METHODS

5.1.1. *Mec* gene detection

The presence of the *mecA1* gene and the *mecA2* gene was followed by PCR technique at a number of 50 strains of methicillin resistant staphylococci isolated from several animal species. The strains subjected to this test were included in the following species: *S. aureus subsp. aureus* (20 strains), *S. hyicus* (7 strains), *S. intermedius/S. pseudintermedius* (5 strains), *S. epidermidis* (5 strains), *S. sciuri* (8 strains) și *S. xylosus* (5 strains).

5.1.2. Differentiating *S. intermedius* from *S. pseudintermedius* species

25 isolates from dogs and cats, that based on phenotypic characters were included in the *S. intermedius* strain were subjected to the PCR technique for differentiation between these two species. Considering the fact that *S. pseudintermedius* is dominant in the last years and that these two species can not be phenotypically distinguished, in these researches the discrimination between these species was made by the mentioned molecular biology technique.

5.1.3. Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD

For the clonal identification of *S. intermedius*/*S. pseudintermedius* strains (34 strains), isolated from dogs and cats, the molecular biology test called Random amplified polymorphic DNA was used.

5.2. OBTAINED RESULTS

5.2.1. Results and discussions on the presence of *mecA1* and *mecA2* genes

The results obtained in the research on the detection of *mecA1* and *mecA2* genes are shown in Table 29. Analysis of these results highlights the presence of *mecA1* and *mecA2* genes in 39 strains, representing 78% of the tested strains.

Table 29

Results of PCR duplex technique

No. crt.	Species	Result		TOTAL
		+	-	
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	18	2	20
2.	<i>S. epidermidis</i>	1	4	5
3.	<i>S. hyicus</i>	7	0	7
4.	<i>S. xylosus</i>	4	1	5
5.	<i>S. intermedius/pseudintermedius</i>	4	1	5
6.	<i>S. sciuri</i>	5	3	8
TOTAL		39	11	50

5.2.2. Results and discussions on the differentiation of *S. intermedius* and *S. pseudintermedius* species

For the genotypic differentiation 25 strains of staphylococci were tested, of which 22 strains were isolated from dogs and 3 strains were isolated from cats.

Using this technique of molecular biology and by using two specific primers, 9 strains (36%) were included in *S. intermedius* species, 6 strains isolated from dogs and 3 strains isolated from cats, while 16 strains, respectively 64%, were included in *S. pseudintermedius* species, all of them being isolated only from dogs.

5.2.3. Results and discussions on Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD

34 strains of *S. intermedius/S. pseudintermedius* were tested through this technique of molecular biology, respectively 22 strains of canine origin and 12 strains of feline origin. Genetic imprinting by this technique was performed with P1 and P2 primers on genomic DNA molecules extracted from the 34 strains.

S. intermedius/S. pseudintermedius strains, isolated from dogs (22 strains) are phylogenetically distant from the feline strains (12 strains), each having its own cluster, respectively different origins.

S. intermedius/S. pseudintermedius strains, isolated from cats, have similar genetic imprints of the same origin, demonstrating their phylogenetic affinity.

The results achieved, in its own research, covered in this chapter were completed by a total of 8 conclusions.

CHAPTER 6. RESEARCH ON THE FREQUENCY OF ANTIBIOTIC RESISTANT PHENOTYPES OF STAPHYLOCOCCI STRAINS

Antibiotic resistance to bacteria is a major issue in veterinary and human medicine, because it is considered a pronounced zoonotic risk phenomenon. The resistance phenotypes to pathogenic bacteria for animals, including staphylococci, have a growing frequency due to the use of veterinary medicinal products, based on antibiotics, especially in animals raised in intensive system.

The researches carried out in this chapter aimed to establish the phenotypic antibiotic resistance, namely the establishment of resistance phenotypes frequency in staphylococci strains isolated animals.

6.1. MATERIALS AND METHODS

The antibiotic resistance profile was determined by the disc-difuzometric method (KIRBY-BAUER method), using the MUELLER-HINTON medium, 20 biodiscs with antibiotics and 412 tested strains of staphylococci, included in 22 species.

6.2. RESULTS OBTAINED AND DISCUSSION OF RESULTS

The results obtained, in the primary form, were processed, centralized and shown in several tables and in graphical form, depending on: antibiotic, animal species and isolates of staphylococci species.

The results obtained after studying the resistance phenotypes, depending on the **class of antibiotics**, which was the **first objective**, were processed and reported in table 32.

Table 32

The behavior of staphylococcal strains to the used antibiotics

Antibiotic	Concentration (µg)	Diameter of inhibition zone (mm)			S		I		R		Tested strains
		S	I	R	No.	%	No.	%	No.	%	
Penicillin G	10	≥37	27-36	≤26	156	37,86	73	17,71	183	44,41	412
Ampicillin	10	≥35	28-34	≤27	169	41,01	100	24,27	143	34,70	412
Ampicillin/Sulbactam	10/10	≥37	30-36	≤29	292	70,87	81	19,66	39	9,46	412
Amoxicillin	30	≥28	22-27	≤21	229	55,58	95	23,05	88	21,35	412
Amoxicillin/Clavulanic acid	20/10	≥36	29-35	≤28	229	55,58	115	27,91	68	16,50	412
Methicillin	5	≥14	10-13	≤9	186	45,14	110	26,69	116	28,15	412
Oxacillin	1	≥20	17-19	≤16	96	23,30	121	29,36	195	47,33	412
Cefoxitin	30	≥29	24-28	≤23	371	90,04	27	6,55	14	3,39	412
Erythromycin	15	≥23	14-22	≤13	124	30,09	56	13,59	232	56,31	412
Clindamycin	2	≥30	25-29	≤24	169	41,01	81	19,66	162	39,32	412
Kanamycin	30	≥26	20-25	≤19	238	57,76	65	15,77	109	26,45	412
Gentamicin	10	≥27	20-26	≤19	240	58,25	100	24,27	72	17,47	412
Tobramycin	10	≥29	20-28	≤19	219	62,93	83	23,85	46	13,21	348
Tetracycline	30	≥30	25-29	≤24	211	51,21	80	19,41	121	29,36	412
Ciprofloxacin	5	≥30	23-29	≤22	270	77,58	38	10,92	40	11,49	348
Enrofloxacin	5	≥20	17-19	≤16	270	77,58	38	10,92	40	11,49	348
Lincomycin	10	≥15	14-15	≤13	179	43,44	59	14,32	174	42,23	412
Novobiocin	30	≥22	17-21	≤16	309	75	92	22,33	11	2,66	412
Furazolidone	50	≥15	11-14	≤10	298	72,33	87	21,11	27	6,55	412
Rimfampicin	30	≥39	35-38	≤34	49	76,56	12	18,75	3	4,68	64

Analyzing the results obtained, it was observed that, in the test strains, antibiotic susceptibility, antibiotic resistance and intermediate behavior to one or more antibiotics had a variable frequency as follows:

- antibiotic susceptibility was between 23,30% (OX) and 90,04% (FOX);

- antibiotic resistance was between 2,66% (NO) and 56,31% (E);
- intermediate behavior was between 6,55% (FOX) and 29,36% (OX).

The second objective pursued in these researches was the behavior of staphylococcal strains and the tested antibiotics, depending on the **species of animals** from which these strains were isolated.

The results showed the presence of the antibiotic resistance phenomenon in the coagulase-positive and coagulase negative staphylococci strains isolated from both livestock animals and pets. Staphylococci strains with multiple antibiotic resistance have a growing frequency and the resistance phenotypes to antibiotics used in therapy show the continued spread of this phenomenon through a two-way animal-human epidemiological circuit.

The third objective pursued in these researches was represented the **frequency of resistance phenotypes for each species of staphylococci**. To monitor the frequency of these phenotypes, several intervals were established, limits of which were expressed in percentage. Also, the isolates of staphylococci were grouped according to the production of free coagulation, respectively in the group of positive coagulase staphylococci and the group of negative coagulase staphylococci.

The frequency of resistance phenotypes from positive coagulase staphylococci is shown in table 34. Following the analysis of the data presented in this table, there are some practical observations on:

- the frequency of resistance phenotypes;
- the number of resistance phenotypes;
- their significance for the use of antibiotics in the treatment of infections produced by positive coagulase staphylococci.

The frequency of resistance phenotypes from negative coagulase staphylococci are shown in table 35. The data presented in this table outline some aspects of the frequency and number of resistance phenotypes identified in the strains of staphylococci belonging to these species.

Table 34

The frequency of resistance phenotypes on coagulase positive staphylococci

No. crt.	Staphylococcal species	Frequency and number of resistance phenotypes					
		≤10%	10,1-20%	20,1-30%	30,1-40%	40,1-50%	>50%
1.	<i>S. aureus subsp.aureus</i>	14: AMS, AML, AUG, CN, TOB, TE, CD, MY, K, P, AMP, E, CIP, ENR	8: AMP, K, CIP, ENR, P, E, CD, MY	7: P, E, CD, MY, AMP, AML, K	0	0	0
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	1: E	0	0	0	0	0
3.	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	13: P, AMP, AML, E, CD, K, CN, TOB, TE, CIP, ENR, MY, AMS	5: CD, MY, AMP, AUG, E	3: E, TE, P	0	0	0
4.	<i>S. hyicus</i>	2: CIP, ENR	3: AUG, CN, TOB	1: K	3: P, AMP, TE	3: E, CD, MY	0

Table 35

The frequency of resistance phenotypes on coagulase negative staphylococci

No. crt.	Staphylococcal species	Frequency and number of resistance phenotypes					
		≤10%	10,1-20%	20,1-30%	30,1-40%	40,1-50%	>50%
1.	<i>S. epidermidis</i>	12: P, AMP, AUG, E, CD, K, CN, TE, CIP, ENR, MY, AML	0	0	0	0	0
2.	<i>S. caprae</i>	5: AMP, AML, AUG, E, K	1: P	0	0	0	0
3.	<i>S. equorum</i>	7: P, AMP, E, K, CN, TOB, MY	0	0	0	0	0
4.	<i>S. felis</i>	4: P, AMP, AUG, MY	0	0	0	0	0
5.	<i>S. gallinarum</i>	1: MY	0	0	0	0	0
6.	<i>S. lentus</i>	0	0	0	0	0	0
7.	<i>S. sciuri</i>	14: P, AMP, E, CD, K, CN, TE, CIP, ENR, MY, AML, AUG, AMS, TOB	8: P, AML, AUG, E, CD, MY, AMP, K	0	0	0	0
8.	<i>S. simulans</i>	2: P, MY	0	0	0	0	0
9.	<i>S. warneri</i>	2: P, MY	0	0	0	0	0
10.	<i>S. xylosus</i>	14: P, AMP, AUG, E, CD, TE, MY, K, CN, TOB, CIP, ENR, AML, AMS	4: P, AML, E, CD	1: CD	1: MY	0	0

The results achieved, in its own research, covered in this chapter were completed by a total of 27 conclusions.

CHAPTER 7. RESEARCH REGARDING THE FREQUENCY OF METHICILLIN RESISTANT STRAINS

Particular attention is paid, in recent years, to methicillin-resistant staphylococci strains, generically known as MRSA staphylococci (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). These strains have a pronounced zoonotic risk and a complex epidemiological circuit, being common in humans as well. Also, resistance to methicillin is associated with multiple antibiotic resistance, especially resistance to penicillins, cephalosporins and aztreonam

Existing data in the literature demonstrate that methicillin resistance is present in both coagulase positive and negative coagulase staphylococci. Expansion of methicillin resistance, from strains of *S. aureus subsp. aureus* to other staphylococci species, is generated by the Staphylococcal Chromosome Cassete *mec-SCCmec* transmission mechanisms, present in the mobile genetic elements of the staphylococcal cytoplasm.

7.1. MATERIALS AND METHODS

The frequency of methicillin resistant strains was pursued at 412 strains of staphylococci, included in 22 species. The frequency of methicillin resistant strains was phenotypically established by two tests and confirmed at 50 strains by the polymerase chain reaction.

The frequency of resistant methicillin strains was determined phenotypically by the **disc-difuzimetric method** (Kirby-Bauer) using methicillin (5 µg), oxacillin (1 µg) and cefoxitin (30 µg).

A number of 210 positive and negative coagulase strains were selected to be passed on the **Chromatic MRSA medium** according to the following criteria:

- presented phenotypic resistance to at least one of the three antibiotics mentioned;
- had intermediate behavior in at least two of those three antibiotics.

7.2. OBTAINED RESULTS

The results obtained, shown in figure 87, show the frequency of resistant methicillin strains detected by the disc-difusometric method, from the total strains of tested staphylococci and depending on the species of animals.

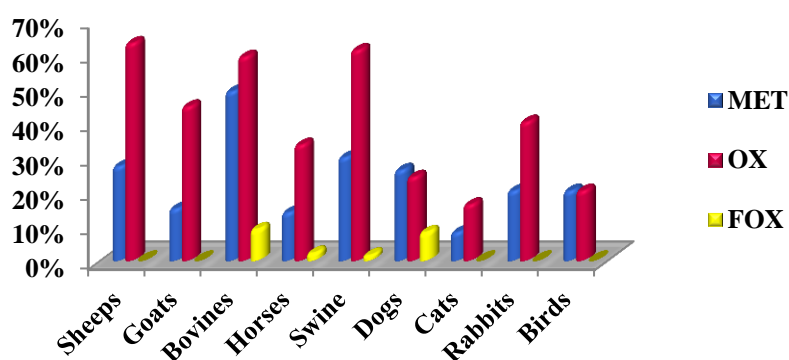


Figure 87. Frequency of staphylococcal strains resistant to MET, OX, FOX

On the **Chromatic MRSA medium**, which is a selective chromogenic medium, strains of *S. aureus subsp. aureus*, resistant to at least one of the three antibiotics, formed mauve or orange colonies of different nuances and the „non-*S. aureus*” staphylococci strains, resistant to at least one of the three antibiotics, formed white or blue colonies. The results obtained on this chromogenic medium are shown in table 37.

Table 37

Results obtained on Chromatic MRSA medium

No. crt.	Staphylococcal species	No. of strains	Chromatic MRSA		Final result
			mauve/orange	white/blue/-	
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	63	63	-	MRSA
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	3	1	2	MRSA
3.	<i>S. hyicus</i>	31	-	31	MRSH
4.	<i>S. intermedius/ S. pseudintermedius</i>	21	-	21	MRSI
5.	<i>S. caprae</i>	5	-	5	MRSC
6.	<i>S. epidermidis</i>	15	-	15	MRSEP
7.	<i>S. equorum</i>	5	-	5	MRSE
8.	<i>S. lentus</i>	1	-	1	MRSL
9.	<i>S. sciuri</i>	30	-	30	MRSS
10.	<i>S. xylosus</i>	36	-	36	MRSX
TOTAL		210	64	152	

Also, in the researches was observed the frequency of strains resistant to MET, OX and FOX, depending on the **species of staphylococci** and the results obtained are shown in table 38.

Resistance of staphylococci species to those three beta-lactamases

No. crt.	Staphylococcal species	No. of rezistant strains						TOTAL	
		MET		OX		FOX		No.	%
		No.	%	No.	%	No.	%		
1.	<i>S. aureus subsp. aureus</i>	31	30,39	50	49,01	1	0,98	82	80,39
2.	<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	0	0	2	50	0	0	2	50
3.	<i>S. hyicus</i>	13	32,5	26	65	1	2,5	40	100
4.	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	9	17,64	11	21,56	3	5,88	23	45,09
5.	<i>S. caprae</i>	0	0	5	62,5	0	0	5	62,5
6.	<i>S. epidermidis</i>	5	15,62	11	34,37	0	0	16	50
7.	<i>S. equorum</i>	2	20	4	40	0	0	6	60
8.	<i>S. felis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	<i>S. gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	<i>S. lentus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	<i>S. sciuri</i>	11	19,29	25	43,85	2	3,50	38	66,66
12.	<i>S. simulans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
13.	<i>S. warneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	<i>S. xylosus</i>	8	12,69	25	39,68	2	3,17	35	55,55

7.3. THE DISCUSSION OF RESULTS

Analyzing the results obtained using the disc-difuzometric technique, it is observed that the frequency of resistant staphylococci strains to these three β -lactamases was different as follows:

- the frequency of methicillin-resistant strains was 1,68 times less than the frequency of oxacillin-resistant strains;
- the frequency of methicillin-resistant strains was 8,3 times higher than the frequency of cefoxitin-resistant strains;
- the frequency of oxacillin-resistant strains was 13,96 times higher than the frequency of cefoxitin-resistant strains.

The results achieved in its own research, covered in this chapter, were completed by a total of 14 conclusions.

CHAPTER 8. GENERAL CONCLUSIONS

The researches covered by the doctoral thesis are finalized by a total of 47 general conclusions of scientific and practical importance, thus completing the existing data in our country regarding the phenotypic and genotypic study of the coagulase positive and negative coagulase staphylococci isolated from livestock animals and pets.