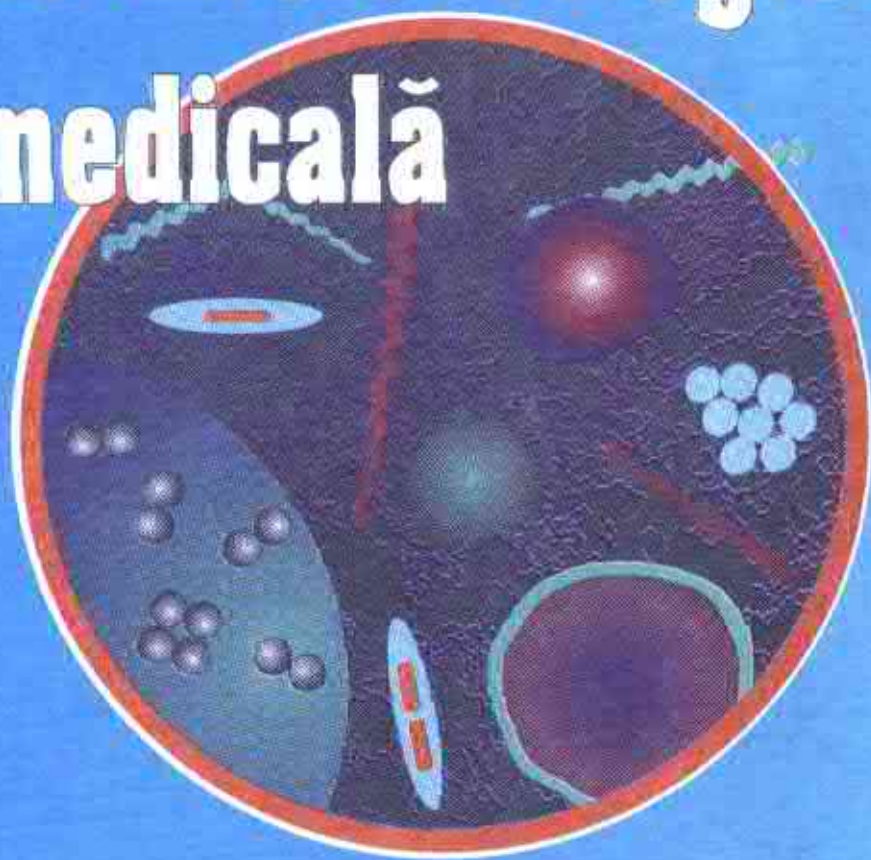


Petru Galetchi · Dumitru Buiuc · Ștefan Plugaru

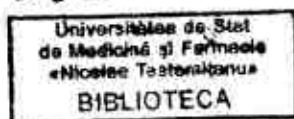
Ghid practic de microbiologie medicală



574267
415
Petru Galetchi · Dumitru Buiuc · Ștefan Plugaru

Ghid practic de microbiologie medicală

588682



sl

I.E.P. Știința Chișinău
Editura Tehnică București
1997

■ Coordonator științific: DUMITRU BUIUC (Iași)

Apariția actualului manual reprezintă o necesitate metodologică utilă pentru studenții Universităților de Medicină în studiul aprofundat al microbiologiei, imunologiei și virusologiei conform cerințelor din programele universitare contemporane și realizărilor noi în teoria și practica medicală.

Prezenta ediție completează actualele manuale și compendii cu informații moderne referitoare la imunologie, taxonomie și clasificare a agenților patogeni în conformitate cu Determinatorul Bacteriologic BERGEY, relevă factorii microbieni de patogenitate, patogenia procesului infecțios și formele clinice.

Sunt elucidate metodele contemporane uzuale și de perspectivă în diagnosticul de laborator al infecției. Fiecare capitol include o enumerare a preparatelor biologice folosite în imunoterapia, imunoprofilaxia și diagnosticul infecției.

Un compartiment aparte îl constituie microbiologia sanitară în care sunt descrise metodele de investigații aplicate în analiza microbiologică sanitară a obiectelor mediului ambiant și interpretarea rezultatelor conform indicilor microbiologici.

Actuala ediție este rodul fructuos de colaborare a profesorilor Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu (Republica Moldova) și Universității de Medicină și Farmacie G. Popa (Iași, România).

■ Editat cu sprijinul Fundației SOROS — MOLDOVA

G $\frac{4107020000-9}{M-004-97}$ La comandă

ISBN 9975-67-009-1

© Text: Petru Galejchi, Dumitru Buluc, Ștefan Plugaru, 1997.

© Copertă: Mihai Bacinschi, 1997.

Partea întâi

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Laboratorul de microbiologie, prin construcție, compartimentare, dotări și funcționalitate trebuie să asigure:

- folosirea cât mai eficientă a forței de muncă;
- securitatea personalului, a colectivității și a probelor examinate.

1.1. PLANUL LABORATORULUI

1.1.1. Planul de ansamblu

Orice laborator de microbiologie presupune următoarele compartimente: de recepție, de investigații, de pregătire a sticlăriei, de preparare și condiționare a mediilor de cultură și a reactivilor, de depozitare (sticlărie, medii de cultură, reactivi), birou, dependențe pentru necesitățile igienice ale localului și personalului. Dimensionarea acestor compartimente este condiționată în ultimă analiză de numărul examenelor solicitate.

Laboratorul de microbiologie trebuie să funcționeze după principiul circuitului în sens unic, cel mai bine realizat prin dispunerea în lungul unui coridor a unor camere care nu comunică între ele, singurul acces în fiecare cameră fiind prin acest coridor (figura 1.1). În

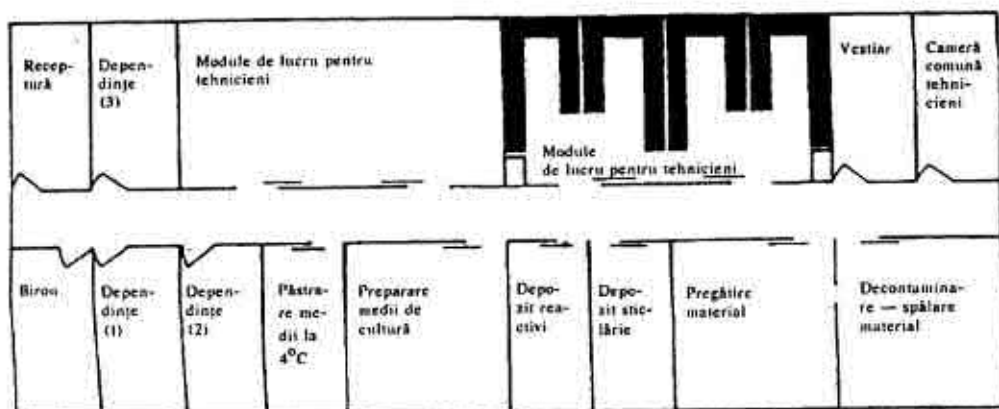


Fig. 1.1. Planul de ansamblu al unui laborator de microbiologie care lucrează cu 12 tehnicieni per tură pentru examenul prelevatelor patologice (sugestie). Observați gruparea modulelor de lucru în «U»

acest mod la o extremitate se efectuează *activitățile «murdare»*, iar la cealaltă extremitate *cele «curate»*. Plasarea diferitelor activități în lungul scalei «curat» spre «murdar» se face în funcție de riscul contaminării. Astfel la o extremitate sunt plasate camerele pentru prepararea și conservarea mediilor de cultură, iar la cealaltă extremitate cele pentru recepționarea și examinarea prelevatelor patologice.

1.1.2. Planul principalelor compartimente

Locurile de muncă trebuie concepute și dotate ca unități în care funcțiile specifice fiecărui compartiment sunt realizate independent de restul laboratorului. Numai în acest mod se pot evita deplasările inutile de persoane și materiale cu risc de contaminare și dăunătoare unei activități eficiente. Doar în cazuri excepționale se va permite deplasarea unor aparate (microscope, centrifuge etc.) dintr-o încăpere în alta, respectând întotdeauna sensul de la «curat» spre «murdar».

În compartimentul de investigație microbiologică sau serologică trebuie rezervați pentru fiecare tehnician cca 16 m², suprafață în care dotările pot fi dispuse ergonomic fără perturbarea reciprocă a aparatelor concomitent în funcție (de exemplu, microscopul nu poate funcționa pe aceeași masă cu centrifuga, frigiderul nu poate fi plasat lângă incubatorul de 37°C).

Pentru laboratoarele mici cu volum redus de analize, încadrate cu un singur tehnician, *locul de muncă* poate fi *dispus liniar* (figura 1.2) și presupune o masă sau o consolă de 2—6 m/75 cm cu blatul la cca 75 cm de la dușumea și un spațiu pentru picioare larg de cca 65 cm și tot atât de înalt, care permite așezarea confortabilă pentru lucru pe un scaun rotativ cu suport solid pentru spate.

Un *modul în «L»* asigură o suprafață mai mare de lucru și poate fi amplasat convenabil în colțurile încăperii. Pe latura mare se poate lucra în poziție așezat, iar latura mică poate fi înălțată la cca 95 cm pentru lucru în poziție ortostatică (figura 1.2).

Modulul în «U» este cel mai eficient pentru o gamă mai diversificată de examene sau examene cu etape multiple (de exemplu, centrifugare, microscopie, însămânțări ș. a.). Frontul minim de lucru pentru un tehnician este de 2 m liniari masă pe fiecare latură a literei «U», de unde rezultă necesară o suprafață de cca 10 m². Pentru activitatea concomitentă a 2 tehnicieni frontul de lucru trebuie să crească la 5,25 m masă pe latura dreaptă și cea stângă ale literei, ceea ce impune o suprafață minimă de 22 m² (figura 1.2).

Pentru laboratoarele mari, care funcționează cu mai mult de doi tehnicieni concomitent, cea mai eficientă este gruparea de module în «E» cu separarea lor parțială prin paravane longitudinale din sticlă (figura 1.2). Avantajele grupării modulelor de lucru în «E» sunt indiscutabile:

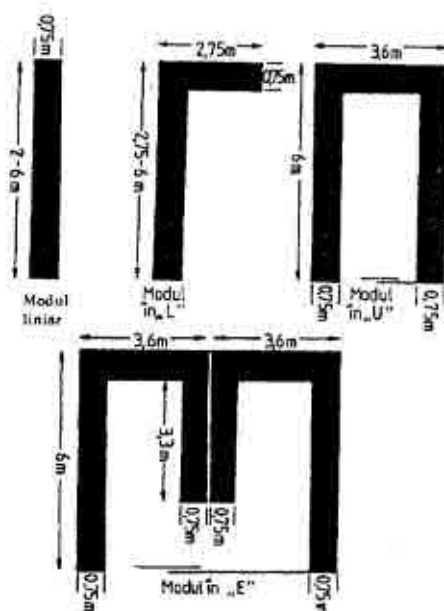


Fig. 1.2. Module de lucru pentru tehnicianul microbiolog, sugestii pentru configurații (după C. R. Baisden, 1985)

- front de lucru mai mare în raport cu suprafața ocupată;
- folosirea în comun de către 2—4 tehnicieni a incintelor pentru securitate microbiologică, a spațiilor de refrigerare, incubare etc.;
- utilizarea cărucioarelor prin spațiul comun în vederea aprovizionării modulelor de lucru cu materialele necesare elimină deplasările frecvente ale personalului;
- dă impresia individualității pentru fiecare tehnician, asigurând însă supravegherea permanentă a activității de către șeful laboratorului.

În compartimentul de spălare și condiționare a sticlăriei dispoziția instalațiilor, aparatelor, mașinilor și a meselor de lucru trebuie să asigure fluxul nestânjenit al materialelor de la autoclavă (ele) pentru sterilizarea recipientelor contaminate spre bacul (mașina) de spălare, rastelul (dulapul) de uscare, mesele de ambalare și etuva(ele) de sterilizare (vezi și 2.3.2). Dispoziția liniară în lungul pereților este satisfăcătoare. Aceeași dispoziție este eficientă și în compartimentul de preparare a mediilor de cultură și reactivilor, unde trebuie să existe o incintă sterilă cu aer laminar pentru condiționarea mediilor de cultură care nu mai suportă sterilizări până la utilizare (de exemplu, turnarea plăcilor cu medii agarizate).

1.2. CONSTRUCȚIA ȘI INSTALAȚIILE

Conductele și rețeaua electrică trebuie incluse în pereți, iar când nu este posibil, urmează să li se asigure un traseu pe pereții culoarului cât mai mare. *Pereții interiori* trebuie să fie netezi și să permită spălarea și dezinfecția periodică. *Tavanul* urmează să absoarbă cât mai bine sunetele, să fie neted, simplu, fără profiluri care rețin praf. *Dușumeaua* trebuie să fie rezistentă, fără fisuri, ușor de spălat și dezinfectat.

Ușile glisante reduc curenții de aer în încăperile cu risc de contaminare. *Ușile batante* trebuie să asigure accesul spre culoar în încăperile termostatate la 4 sau 37°C (figura 1.1).

Laboratorul necesită următoarele *instalații*: electrică, de gaz, de apă rece, caldă și deionizată, de încălzire și de aer condiționat. Existența unei instalații centrale de aburi condiționează folosirea autoclavelor orizontale moderne. În limita posibilităților, o instalație centrală de vacuum și una de aer comprimat ameliorează mult condițiile de lucru.

Instalațiile de aer condiționat și de încălzire trebuie să asigure temperatură și umiditate constantă pe tot parcursul anului, reducând la minimum curenții de aer în arile de activitate.

Sistemele exhaustoare vor fi prevăzute pentru locurile de lucru unde apar vapori iritanți (manipularea unor reactivi), aburi (funcționarea autoclavelor, mașinilor de spălat etc.) sau mirosuri neplăcute (culturi ale bacteriilor anaerobe, enterobacteriacee).

Iluminarea corectă a locurilor de lucru, fără reflexe sau umbre supărătoare, asigură precizia manipulărilor. Pentru aceasta tehnicienii vor lucra în fața ferestrelor, iar corpurile de iluminat și tuburile fluorescente, care asigură lumină «de zi», vor fi fixate pe tavan. Sursele suplimentare de lumină pot fi plasate după necesitățile fiecărui loc de activitate.

Este foarte important ca instalația electrică să facă față sarcinii impuse de funcționarea concomitentă a aparatelor din laborator sau din restul clădirii (mai ales când în circuit intră mari consumatori ca aparatura radiologică, stația centrală de aer condiționat etc.) și să asigure curentul sub tensiune stabilizată. Prizele vor fi prevăzute la distanțe de 1,5—2 m una de alta în compartimentele de lucru, inclusiv în lungul fronturilor de lucru multimodulare.

Chiuvele din materiale necorozive cu instalație de apă rece și caldă trebuie prevăzute la extremitatea fiecărui modul de lucru al tehnicienilor. Bacurile din compartimentul de spălare a sticlăriei impun aceleași exigențe.

1.3. MOBILIERUL

Mai convenabil este mobilierul de tip modular, care poate fi confecționat din lemn, oțel sau masă plastică rezistentă.

Blatul meselor trebuie să fie neted, neinflamabil, impermeabil și necoroziv, pentru a fi ușor de spălat și dezinfectat. Culoarea neagră evită reflexele supărătoare și permite urmărirea facilă a culturilor în plăci Petri, a reacțiilor de aglutinare pe lamă etc. Sticla *Securit* neagră satisface toate aceste exigențe.

Dulapurile cu ușă glisantă plasate pe masă și sub masa de lucru asigură depozitarea materialelor necesare fiecărui modul de lucru. Este indicată și ancorarea lor la perete.

Rafturile sunt necesare spațiilor de depozitare. Pentru sticlărie, medii de cultură și chimicale necorozive, mai convenabile sunt cele din lemn sau aluminiu.

1.4. ECHIPAMENTUL

Repartiția echipamentului de laborator depinde de profilul fiecărui loc de activitate (tabelul 1.1).

1.4.1. Microscopie și lupe

Microscopul optic cu fond luminos intră în dotarea fiecărui modul de investigație microbiologică. *O lupă de mână* este necesară pentru examinarea coloniilor, iar *o lupă stereoscopică* facilitează urmărirea coloniilor foarte mici.

Pentru *microscopia cu fond negru, cu contrast de fază și cu fluorescență* este necesară *o cameră obscură*.

Amănunte privind microscopie vezi în capitolul 5.

1.4.2. Incubatoare, băi de apă sau de nisip

Incubatoare de 35—37°C cu volume adecvate pot fi repartizate la fiecare modul de lucru. Cele reglate la alte temperaturi vor fi repartizate numai modulelor unde sunt necesare și pot fi utilizate în comun.

Camerele termostatare la 35—37°C sunt necesare pentru incubarea culturilor în volume mari sau /și celor cu creștere lentă (de exemplu, cultivarea micobacteriilor, hemoculturi etc.). Pot fi amenajate în încăperi mici, speciale sau în colțul unei încăperi mari. Dacă încăperea este prea înaltă, se va instala un tavan improvizat. Pereții vor fi bine izolați termic, iar ușa, glisantă prevăzută cu garnituri de etanșare. Instalația de încălzire electrică, termostatare, trebuie să asigure repartiția uniformă a temperaturii, controlate prin termometre plasate la 0,5 și 2 m de la podea. Suprafețele interioare placate cu material plastic, dușumeaua din scândură de lemn tare, cât și rafturile din aluminiu trebuie să

reziste la umiditatea proprie acestor incinte, precum și la spălarea și decontaminările frecvente necesare combaterii prafului și a mucegaiurilor.

Băile de apă, pentru inactivarea unor suspensii microbiene și deocomplementarea serurilor sau incubarea unor reacții antigen-anticorp, trebuie termostatate și prevăzute cu capac, preferabil din sticlă, inclinat, pentru a permite scurgerea apei de condens.

Baia de nisip termostată la 75—85°C este necesară pentru coagularea în pantă a unor medii de cultură și tyndallizarea lor.

Tablul 1.1. Echipamentul compartimentelor din laboratorul de microbiologie

<i>Locul de muncă al microbiologului</i>	
Anse Pipete Pasteur Pensă Tamponae Baghete de lemn Etalon nefelometric Bec de gaz sau incinerator electric Lame și lamele de microscop Platină încălzitoare Stativ pentru colorații Baterie de coloranți și reactivi pentru microscopie Microscop, lupă Centrifugă și balanță pentru echilibrare Trompă de apă	Baie de apă Incubator Frigider Pipete gradate Propipete Plăci din material plastic cu godeuri pentru reacții serologice Eprubete Plăci Petri Stativ pentru eprubete Țăvi pentru flacoane Containere pentru materialul contaminat Borcane pentru pipete contaminate Incintă de siguranță microbiologică
<i>Camera pentru receptura prelevatelor patologice¹</i>	
Registre Stativ pentru eprubete Țăvi pentru flacoane Incubator de 37°C	Frigider Tamponae și recipiente pentru prelevarea probelor (sunt preluate prin delegații secțiilor din spital)
<i>Sectorul pentru spălarea și pregătirea sticlăriei</i>	
Autoclavă; de preferat verticală cu perete simplu Bacuri, lighene și căldări din plastic, seturi de perii și instalație pentru spălat pipete	Preferabil, o mașină pentru spălat sticlăria Dulap pentru uscat sticlăria spălată sau, în lipsă, rastele corespunzătoare Etuve Cutii pentru ambalarea materialelor de sterilizat
<i>Sectorul pentru prepararea/condiționarea mediilor de cultură și a reactivilor</i>	
Autoclavă (e) Baie de apă Baie de nisip Mic incubator de 60°C pentru testele biologice de sterilizare Balanță tehnică Balanță farmaceutică Balanță analitică Agitator electromagnetic	Pompă de vid sau trompă de apă Filtre sterilizante pentru lichide Distribuitoare pentru medii de cultură Incintă cu curent de aer laminar pentru repartiția aseptică a mediilor de cultură Seturi de recipiente pentru condiționarea mediilor de cultură și reactivilor
¹ NOTĂ: În policlinici sectorul de receptură va fi prevăzut cu o cameră(e) pentru prelevarea probelor de la pacienții programați. Echipamentul necesar camerei de prelevare a probelor poate fi urmărit în capitolul 3, în funcție de nomenclatorul analizelor efectuate de laborator.	

1.4.3. Refrigeratoare

Frigiderele de 4°C cu volume corespunzătoare pot fi repartizate individual sau grupate pe module de lucru. Conservarea mediilor de cultură condiționate pentru lucru, a unor reactivi etc. în laboratoarele mari se face în *camere frigorifice*. *Conservatoarele de -25°C* vor fi instalate într-o încăpere separată.

1.4.4. Centrifuge

Centrifugele de 3 000 rot/min, care asigură sedimentarea bacteriilor din volume de 15—50 ml într-un interval de timp rezonabil, sunt suficiente pentru activitățile curente din laboratorul de microbiologie. Sunt de preferat cele cu rotor orizontal celor cu rotor angular, pentru că generează mai puțini aerosoli. Din aceleași motive de securitate microbiologică se vor folosi pentru centrifugare numai tuburi cu capac înșurubat sau aplicat. Câte o centrifugă, cu balanța pentru echilibrarea tuburilor, va fi repartizată la fiecare modul unde se impune sedimentarea bacteriilor și celulelor (examenul lichidului cefalorahidian, al urinei etc.).

Reguli pentru folosirea centrifugelor:

1. Se selectează două tuburi egale între ele ca lungime și grosime. În unul se repartizează fluidul de centrifugat, în celălalt, apă, la o înălțime egală, fără a depăși o limită de 2 cm sub buza tuburilor.
2. Se plasează tuburile în cupele perechi ale centrifugei și se așază vertical perechile tub—cupă în stativul de pe talerele balanței.
3. Folosind o pipetă Pasteur, se toarnă alcool de 70° în cupa mai ușoară până la echilibrare.
4. Se plasează în rotor, diametral opus, perechile cupă—tub echilibrate.
5. Se închide capacul centrifugei.
6. Se mărește treptat viteza de centrifugare până la accelerația dorită.
7. La sfârșit, se deschide centrifuga numai după oprirea completă a rotorului.

Precauții:

1. Se verifică dacă amortizoarele de cauciuc sunt în cupe; astfel se va evita spargerea tuburilor.
2. Se verifică echilibrul inițial al balanței.
3. Nu se va echilibra tubul de centrifugat cu un tub de altă formă sau cu un tub care conține material solid. Deși masele vor fi egale, poziția diferită a centrelor de greutate în timpul centrifugării va produce vibrații periculoase prin dezechilibrarea centrifugei.
4. Se verifică dacă perechile cupă—tub au fost plasate diametral opus, mai ales la rotoarele multiloculare.
5. Nu se centrifughează materialul infecțios în tuburi fără capac și nici în tuburi cu dop infundat, pentru că se va infunda și mai tare, cele de bumbac pătrunzând în fluidul din tub.
6. Nu se forțează cu mâna frânarea rotorului.

1.4.5. Balanțe

Sunt necesare următoarele tipuri de balanțe:

- Balanțe tehnice pentru prepararea mediilor de cultură, soluțiilor saline și a soluțiilor dezinfectante în volume mari.
- Balanțe farmaceutice pentru prepararea soluțiilor de coloranți și a soluțiilor de reactivi sau unor medii de cultură în volume mici.
- Balanță(e) analitică(e) pentru cântărirea exactă a antibioticelor etalon sau a unor reactivi în cantități mici.
- Balanțe pentru echilibrarea tuburilor de centrifugă: balanțe mici cu două talere prevăzute cu stativ pentru cupe.

1.4.6. Omogenizatoare, agitatoare, dispozitive de triturare a țesuturilor și rupere a celulelor

Curent, pentru triturarea și omogenizarea țesuturilor sunt folosite mojară sau, mai eficient pentru volume mici, tuburi Griffith. După caz, triturarea țesuturilor se poate face în stare nativă sau congelată, folosind sau nu substanțe abrazive (pulbere de cuarț, sticlă Pyrex etc.). În laboratoarele mari, pentru activitatea de cercetare pot fi utilizate omogenizatoare cu mare viteză cu cujite și dezintegratoare ultrasonice.

Agitatoare rectilinii (cu mișcare de du-te-vino) sunt folosite mai des pentru aerarea culturilor bacteriene în bulion. Agitatoarele rotative tip Vortex sunt utile fiecărui tehnician pentru omogenizarea tuburilor cu suspensii bacteriene, pentru solvirea rapidă a unei substanțe în volume mici în eprubete, iar cele electromagnetice pentru a favoriza solvirea unor substanțe la o temperatură dată în volum mediu de diluent (în flacoane Erlenmeyer).

1.4.7. Aparat pentru distilarea apei

Aparatele pentru distilat apa necesară mediilor de cultură trebuie să fie din sticlă. Pentru alte destinații apa poate fi distilată și în aparate metalice.

1.4.8. Distribuitoare pentru medii de cultură

În laboratoarele mici se poate folosi un dispozitiv cu pâlnie sau o pipetă Chamberlain.

Dispozitivul cu pâlnie. La o pâlnie cilindrică sau conică de 1—2 l, prevăzută cu capac, se adaptează un tub de cauciuc sau plastic autoclavabil terminat cu un tub de sticlă etilat. O clemă, manipulată manual, deschide și închide circuitul. Întregul dispozitiv, sterilizat la autoclavă, este fixat pe un stativ de retortă și permite repartizarea în tuburi a unor volume aproximativ egale, prin comparație cu un tub martor, în care este măsurat volumul dorit. Volumele egale de mediu se pot repartiza semiautomat, dacă la dispozitivul cu pâlnie se adaugă o seringă. Asepsia însă nu poate fi garantată, deci dispozitivul nu poate fi folosit la repartizarea mediilor care nu se mai pot steriliza înainte de utilizare.

Pipeta Chamberlain este mai convenabilă pentru repartizarea în plăci a mediilor agarizate. Pipeta cu tubulatură anexată se sterilizează la autoclavă. Aspirând cu gura prin tubul A, mediul sterilizat este introdus în balonul B până la nivelul dorit. Pentru repartizare, tubul C se introduce în recipientul de umplut inclinând balonul B. Scurgerea mediului încetează când balonul B este readus la orizontală, pentru ca nivelul fluidului să

ajungă sub orificiul superior al tubului C.

Pentru repartizarea unor volume exacte de mediu în laboratoarele mari sunt indicate *aparate automate de repartizat*, care funcționează cu pompă peristaltică sau cu pompă tip seringă acționate prin pedală, manual sau electric.

1.4.9. Containere pentru materialul contaminat

Găleți cu capac din tablă de cupru sau emailată, cu diametre și forme corespunzătoare autoclavelor din sectorul de spălare a sticlăriei, sunt folosite pentru colectarea materialelor reutilizabile de la fiecare loc de lucru.

Saci din material plastic rezistent sunt utilizați pentru colectarea și transportul către autoclavă și subsecvent la incinerator, al materialelor de unică folosință contaminate. Acești saci vor fi evident marcați: «Material contaminat de laborator. Pericol de infecție». Vor avea o anumită culoare pentru a nu fi confunziți cu sacii în care se transportă halatele murdare ale personalului de laborator.

Borcanne cu soluție dezinfectantă pentru colectarea pipetelor gradate reutilizabile, separat de pipetele Pasteur, lame și lamele de microscop sau alte articole mici de unică folosință, trebuie prevăzute pentru fiecare loc de lucru.

1.4.10. Aparatură și dispozitive pentru sterilizare și dezinfecție (vezi capitolul 2)

1.4.11. Incinte de siguranță microbiologică (vezi 1.5.5)

1.4.12. Echipament din sticlă, plastic și articole mici de laborator

Recipientele utilizate în microbiologie trebuie să fie din sticlă neutră, pentru a nu altera pH-ul conținutului, și suficient de groasă, pentru a evita contaminarea mediului prin spargerea lor.

Articolele din plastic sunt de două categorii: cu unică folosință și reutilizabile. Cele cu unică folosință, cum sunt cutiile Petri, containerele pentru prelevate patologice, ansele calibrate, se distrug prin autoclavare, de aceea sunt ambalate și sterilizate de către producător. Cele reutilizabile pot fi sterilizate prin autoclavare.

Eprubetele trebuie să aibă gura dreaptă, fără bor. Cele mai convenabile dimensiuni sunt 120 × 12 mm pentru volume de 2—4 ml mediu, 160 × 16 mm pentru volume de 5—10 ml, 200 × 20 mm pentru volume de 10—15 ml și 250 × 25 mm pentru volume de 20 ml.

Tuburile Durham sunt mici tuburi de sticlă de 25—30 × 5—6 mm închise la un capăt și introduse cu gura în mediul de cultură lichid pentru a detecta formarea de gaz.

Baloanele cu fund plat și flacoanele Erlenmeyer cu volume de la 100 până la 1000 ml sunt utilizate pentru păstrarea mediilor de cultură preparate.

Curent, în laboratoarele noastre eprubetele și flacoanele sunt bușate cu dopuri de vată nehidrofilă învelită în tifon. Protecția temporară de contaminare poate fi asigurată prin acoperire cu o foaie de aluminiu. Cea mai sigură este însă închiderea eprubetelor și

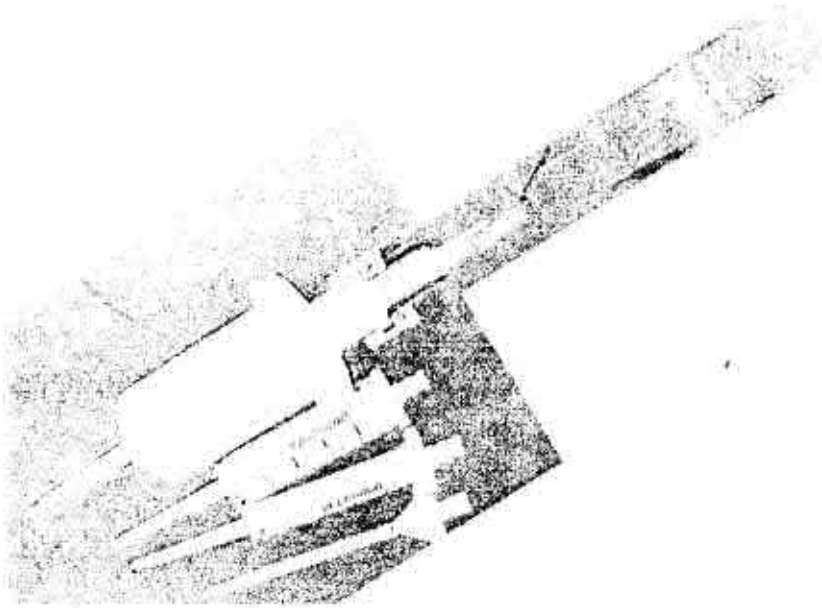


Fig. 1.3. Pipeta Ependorf digitală ajustabilă pentru volume variate

flacoanelor prin capace de polipropilenă înșurubate. Acestea sunt fabricate în diferite culori și sunt reutilizabile.

Cuții Petri. Cutiile din sticlă sunt încă larg utilizate. Cele din sticlă borosilicat suflată nu se zgărie, sunt perfect plate și ușor de stivuit, dar sunt scumpe, fragile și impun atenție la spălare. Cele din sticlă presată sunt mai groase, au striuri și fundul mai mult sau mai puțin convex, se zgărie ușor, dar sunt mai ieftine și mai rezistente.

Cutiile Petri din plastic cu utilizare unică sunt ieftine, perfect plate, ușor de manipulat și stivuit, dar presupun o industrie specializată capabilă să le producă.

Recipiente pentru prelevate patologice. În țările dezvoltate se folosesc containere universale din plastic dispozabil, cu volum de 28 ml și capac înșurubat. Pentru probele cu volum mare sunt indicate borcane rezistente cu capac înșurubat. În lipsa acestor facilități se poate recurge la flacoane farmaceutice cu gură largă și capac înșurubat, borcane din sticlă cu volum de 200—400 ml și capac înșurubat sau aplicat (mai puțin sigur).

Pipete Pasteur. Furnizorii industriali oferă pipete Pasteur din sticlă sau polipropilenă scurte și lungi, cu calibrul de 6—7 mm. Acestea se sterilizează, ca și pipetele gradate, ambalate în cutii de aluminiu. În lipsă, pot fi manufacturate în laborator din tub de sticlă.

Pipetele gradate din sticlă cu capacitate de 1; 2; 5; 10 și 25 ml se folosesc bușate cu vată nehidrofilă la extremitatea de sucțiune pentru a preveni contaminarea fluidului pipetat cu microbi din propipetă. Eventualele mustăji de vată din afara orificiului trebuie arse în flacără înainte de a adapta pipeta la propipetă, altfel adaptarea nu este etanșă din cauza vatei prinse între sticla pipetei și propipetă și se va pierde din conținutul pipetei.

Propipetele. În laboratorul de microbiologie aspirarea cu gura a fluidului în pipete este interzisă. Pipetarea se va face numai cu propipete. Cea mai simplă propipetă este o pară de cauciuc adaptată la extremitatea de sucțiune. Pipetări exacte și mai comode permite

o pară de cauciuc prevăzută cu supape sau diferite tipuri de propipete automate cu volume reglabile, la care se adaptează pipete gradate sau vârfuri din plastic dispozabile (figura 1.3).

Lame și lamele de microscop. Pentru necesitățile microscopiei în microbiologie sunt suficiente lamele cu margini simple, mai ieftine decât cele cu margini polizate. Reamintim că obiectivele puternice sunt corectate numai pentru lamele cu grosimea de 0,17 mm (sau nr. 1), de formă pătrată, livrate în cutiuțe cu 100 bucăți.

Stative și panere. Pentru tuburi și flacoanele cu medii de cultură sunt indicate stative autoclavabile din propilenă sau metal acoperit cu propilenă, care reduc riscul spargerii eprubetelor, un dezavantaj al stativelor din metal. Stativele din lemn sunt neigienice.

Coșurile din sârmă sunt riscante pentru incubarea și transportul eprubetelor cu culturi: riscul spargerii și scurgerii lichidului. Pentru eprubete sunt mai convenabile cutii din propilenă, iar pentru flacoane, tăvi din aluminiu dimensionate pentru 10—100 flacoane, după calibrul lor. Coșurile din sârmă rămân rezervate numai recipientelor cu material neinfecțios.

Firul de însămânțare este confecționat din sârmă inoxidabilă de platină sau crom-nichel cu grosime în funcție de consistența materialului microbial de manipulat. Este fixat într-un portfir din metal, care trebuie ținut perfect curat prin frecare periodică, ușoară, cu șmirghel fin, a extremității inferioare pentru îndepărtarea materialului carbonizat. Portfirul din sticlă este contraindicat.

Firul drept (perfect drept) se utilizează pentru însămânțări prin înțepare, *ansa* (firul buclat la o extremitate), pentru însămânțarea în medii lichide și pentru epuizarea inoculului în striuri pe suprafața mediilor solide, iar *firul spatulat*, pentru manipularea coloniilor microbiene cu consistență deosebită (figura 1.4).

Etalorul de inoculum este o baghetă din sticlă cu diametrul de 3—4 mm cudadă în L prin încălzire în flacără la cca 36 mm de extremitate. Se folosește pentru cantificarea bacteriilor prin dispersia uniformă pe placa cu mediu agarizat a unui volum dat de inoculum.

Becuri de gaz. Becurile Bunsen oferă o flacără cu temperaturi de la 700 la 1000°C, în funcție de aerare, care se face la presiunea atmosferică, prin două orificii diametral opuse la partea inferioară a becului. Becurile Mecker oferă o flacără mai mare și mai fierbinte: de la 700 la 1200°C, când aerarea se face la presiunea atmosferică, prin coroana de orificii de la baza becului, sau 1700°C, când arderea se întreține cu aer comprimat.

Alte articole de dimensiuni mici necesare locului de lucru al microbiologului. Pensa de disecție, bisturiul, foarfecele pot fi ținute la dispoziție, împreună cu ansele, într-un pahar conic. Tampoanele de vată similare celor pentru prelevarea exsudatelor de pe suprafețe (figura 3.1) sunt necesare etalării inoculului pentru antibiograma difuzimetrică. Tijele porttampon din lemn (baghete) sterilizate în cutii de aluminiu sunt utile pentru manipularea probelor de spută, bucățile de pânză pentru dezinfecția curentă a suprafețelor sau după scurgeri accidentale de material infecțios.

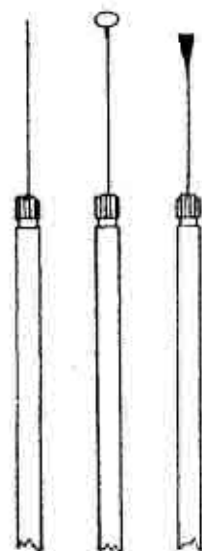


Fig. 1.4. Fire pentru însămânțare

1.5. REGULI DE COMPORTARE ȘI REGIMUL ANTIEPIDEMIC

Activitatea în laboratoarele de microbiologie implică riscul contractării unor infecții, care pot fi grave. Prevenirea infecțiilor de laborator și răspândirii lor eventuale în colectivitate impune cunoașterea:

- riscului potențial reprezentat de microorganismele manipulate;
- căilor prin care ele pătrund în organism;
- metodelor corecte de limitare a accesului acestor organisme la căile de transmitere și porțile de intrare în organism.

1.5.1. Clasificarea microorganismelor în funcție de riscul infecțios

Organizația Mondială a Sănătății clasifică agenții infecțioși în patru grupe de risc infecțios individual și pentru colectivitate (tabelul 1.2).

Tabelul 1.2. Clasificarea agenților infecțioși în raport cu riscul infecției de laborator (după O. M. S., 1983)

Grup	Risc	Exemple
I	Individual redus Colectiv redus	Microbi nepatogeni pentru adultul sănătos; posibili oportuniști pentru gazda imunocompromisă: <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , vaccinuri vii atenuate;
II	Individual moderat Colectiv redus	<ul style="list-style-type: none"> ■ Nematode (stadii infective), trematode, cestode, protozoare parazite pentru om ■ Fungi dermatofiti sau oportuniști ■ Bacterii: <ul style="list-style-type: none"> Bacili dizenterici Bacil difteric Bacili tifici <i>Clostridium tetani</i> Salmonelle netifoidice Micobacterii condiționat Vibrioni patogene Stafilococi aurii Spirocheți Pneumococi <i>Legionella</i> ■ Virusuri: <ul style="list-style-type: none"> Virusul gripal Enterovirusuri Herpesvirusuri umane Agenți ai encefalopatiei Poxvirusuri spongiforme transmisibile (altele decât virusul variolei) ■ Numai pentru microscopie, izolare și identificare uzuală: <ul style="list-style-type: none"> Streptococi piogeni <i>Yersinia pestis</i> Meningococi <i>Bacillus anthracis</i> Gonococi <i>Clostridium botulinum</i> <i>Pseudomonas pseudomallei</i> Virusul CML ■ Numai la microscopia și insămânțarea prelevatelor patologice: <ul style="list-style-type: none"> Bacili tuberculozei <i>Brucella</i> <i>Francisella tularensis</i> Fungi dimorfi ■ Numai la manipulări nonpropagative (serologie, colorarea amprentelor de organ): <ul style="list-style-type: none"> Rickettsii (tifos exantematic, Virusurile hepatitelor febre pătate) B, C <i>Coxiella burnetii</i> HIV

Grup	Risc	Exemple
III	Individual mare Colectiv redus	<ul style="list-style-type: none"> ■ De la inoculare până la identificare: Rickettsii (tifos, febre pătate) <i>Coxiella burnetii</i> ■ Numai la manipularea culturilor: Bacilii tuberculozei <i>Brucella</i> <i>Francisella tularensis</i> ■ Numai la manipularea materialelor cu spori infecțanți (sol, cultura formelor filamentoase): Fungi dimorfi ■ Numai când există risc de aerosoli: concentrare de material infecțios, manipularea culturilor în cantități mari: Gonococ <i>Pseudomonas pseudo-</i> Meningococ <i>mallei</i> <i>Bacillus anthracis</i> Virusurile hepatitelor B, C <i>Clostridium botulinum</i> Virusul CML ■ Numai când este risc de aerosoli sau se manipulează tul- pini rezistente la antibiotice: <i>Yersinia pestis</i>
IV	Individual mare Colectiv mare	Virusurile febrei hemoragice: Junin, Marburg, Congo-Crimea, Omsk, Lassa, Ebola, Machupo Virusul encefalitei acariene de primăvară-vară

1.5.2. Cai de transmitere și porți de intrare în organism ale infecțiilor de laborator

Agenții infecțioși pătrund în organism prin mucoasa digestivă (ingestie), prin pulmoni (inhalare), prin piele (injectare) și prin conjunctiva oculară (tabelul 1.3).

Riscul ingestiei de agenți infecțioși apare în cursul pipetării cu gura, a introducerii în gură a degetelor și obiectelor de pe mesele de laborator (creioane, țigări, alimente) contaminate prin scurgeri sau stropiri neobservate ori fiind insuficient dezinfectate.

Tabelul 1.3. Doze infecțioase pentru 25–50% din voluntari (după W. E. Barkley și A. G. Wedum, 1977)

Boală sau agent cauzal	Cale de pătrundere	Doză ¹
Febră Q	Inhalare	10
Tularemie	Inhalare, transcutan, ingestie	10
Sifilis	Intradermic	57
<i>Shigella flexneri</i>	Ingestie	180
Antrax	Inhalare, transcutan, ingestie	1300
Febră tifoidă	Ingestie	10 ⁵
<i>Shigella sonnei</i>	Ingestie	≥10 ⁵
Holeră	Ingestie	10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	Ingestie	10 ⁸

¹Doza în număr de organisme

Riscul inhalării apare la manipulări generatoare de aerosoli ale materialelor

infecțioase (tabelul 1.4). Mari generatoare de aerosoli sunt culturile liofilizate la deschiderea sau spargerea fiolelor (1 215 particule viabile/m³ aer, respectiv 43 551/m³) sau spargerea unor flacoane cu cultură (13 959 particule viabile/m³).

Tabelul 1.4. Rangul particulelor viabile din eșantioane de aer prelevate în cursul unor proceduri de laborator sau accidente generatoare de aerosoli (după W. E. Barkley și A. G. Wedum, 1977)

Procedură de laborator	Particule viabile
Pipetarea a 50 ml cultură în eprubetă de 50 ml	0—5,5
Scoaterea dopului de bumbac de la un tub centrifugat	0,8—5,0
Scoaterea dopului de bumbac umezit după agitatea unui flacon	0—35
Epuizarea inoculului pe placă Petri	0—20
Introducerea ansei fierbinți în 100 ml cultură	6—24
Decantarea într-un flacon a culturii centrifugate	0—115
Agitarea unei culturi în omogenizator cu capacul insuficient strâns	77—1246
Spargerea unui tub de 50 ml în centrifugă	80—1800

Stropii de fluid infecțios ajunși în ochi pot determina infecții grave.

Transmiterea transcutană a infecțiilor de laborator se poate realiza prin înțepături cu ace de seringă, pipete Pasteur sau cioburi de sticlă contaminate, prin contaminarea plăgilor tăiate, zgâriate, a abraziunilor, chiar minuscule, nesesizate.

Infecțiile de laborator sunt contractate pe căi diferite și cu doze mai mari decât în mod natural. De aceea evoluția lor este atipică și frecvent gravă.

1.5.3. Clasificarea laboratoarelor în funcție de exigența siguranței antiinfecțioase

Un laborator este autorizat să manipuleze microorganisme cu un anumit grad de risc numai în măsura în care personalul este pregătit, are dotările necesare și poate aplica metodele de siguranță pentru a preveni răspândirea agenților infecțioși în mediul unde sunt manipulați sau menținuți. Organizația Mondială a Sănătății a stabilit patru niveluri de exigență: nivelurile 1 și 2 corespund laboratoarelor de bază, nivelul 3 laboratoarelor cu regim restrictiv și nivelul 4 celor cu regim de maximă restricție (tabelul 1.5).

Nivelurile 1 și 2: laboratoarele de bază în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul I sau II. *Exigențele* privind construcția, instalațiile, mobilierul și echipamentul sunt cele prezentate mai sus (vezi 1.1—1.4). Siguranța antiepidemică este asigurată dacă în aceste condiții de dotare și facilități se utilizează o bună tehnică microbiologică (vezi capitolele 2, 3, 6, 10), iar intrarea în toate spațiile cu risc biologic este corect marcată (figura 1.5).



BIOHAZARD

Fig. 1.5. Semnul internațional pentru risc biologic

Tabelul 1.5. Clasificarea laboratoarelor după nivelurile de exigență ale siguranței antiinfecțioase (după O. M. S., 1983)

Grupe de risc	Laboratoare		Exigențe impuse	
	clasificare	exemple	regim de activitate	echipament de siguranță
I	Nivel 1: de bază	Din învățământul secundar	BTM ¹	Fără. Lucru pe masă deschisă
II	Nivel 2: de bază	Clinice De sănătate publică Din învățământul universitar	BTM plus halat de protecție; semnalizarea riscului biologic	Lucru pe masă deschisă plus incintă de siguranță pentru activități generatoare de aerosoli
III	Nivel 3: regim restrictiv	Din laboratoare de analiză specializate	Nivelul 2 plus halat, mască, mănuși de protecție și acces controlat	Incintă de siguranță pentru toate activitățile
IV	Nivel 4: regim de maximă restricție	Din laboratoare care lucrează cu microorganisme foarte periculoase	Nivelul 3 plus control strict al evacuării aerului, apelor reziduale și materialelor dis- pozabile	Incintă de siguranță de clasa III

¹ BTM: Bună tehnică microbiologică.

Nivelul 3: laboratoarele cu regim restrictiv, în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul III. *Exigențe:*

- controlul strict al comunicării încăperilor; nu se admit tavane improvizate și alte comunicări între încăperi decât prin ușă care poate fi zăvorâtă;
- ventilație în sens unic cu presiune negativă în camerele de lucru și filtrarea aerului extras din încăperi;
- manipularea microorganismelor numai în incinte de siguranță contra aerosolilor (clasele I și II);
- semnalizarea riscului biologic (figura 1.5) la intrarea încăperilor și acces restrictiv în încăperi.

Nivelul 4: laboratoarele cu regim de maximă restricție, în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul IV, funcționează în regim de *exigență specială* care depășește scopurile acestei cărți.

1.5.4. Barierele antiinfecțioase

În laboratoarele de microbiologie diferențiem trei bariere antiinfecțioase:

- bariere primare, care previn răspândirea unui microb în laborator;
- bariere secundare, care protejează personalul în cazul depășirii accidentale de către microorganisme a barierelor primare;
- bariere terțiare, care previn răspândirea în comunitate a microorganismelor care au depășit barierele primare și secundare.

Barierelor primare reunesc tehnici și echipamente prin care se previne formarea de aerosoli și accesul microorganismelor la personal:

1. Toate prelevatele patologice și umorile organismului sunt potențial infectante. Se etichetează cu însemnul riscului biologic probele care provin de la pacienți cu SIDA și cu hepatite sau pot conține alte microorganisme din grupele III și IV de risc.

2. Nu se pipetează cu gura. Se folosesc numai propipete sau dispozitive de pipetare.
3. La locul de lucru, nu se introduce în gură nici un obiect: propipete tubulare, etichete, creioane, pixuri, ژیاری, pipă, degete, alimente, băuturi.
4. Se restrânge la strictul necesar folosirea obiectelor ascuțite: ace de seringă (dacă pot fi înlocuite cu canule), pipete Pasteur din sticlă (dacă pot fi înlocuite cu pipete capilare din plastic).
5. Sticlăria ciobită sau cu fisuri se înlocuiește.
6. Se respectă întocmai tehnica de centrifugare a materialului infecțios. Suspensiile microorganismelor din grupele III și IV de risc se centrifughează numai în centrifugă cu cupe închise.
7. Se folosesc numai anse de inoculare complet închise, cu buclă de maximum 3 mm, pentru a evita descărcarea spontană, și firul nu mai lung de 5 cm, pentru a reduce vibrațiile care pot descărca materialul manipulat.
8. La manipularea cu ansa a materialelor vâscoase (de exemplu spută) sau puțin aderente la spatulă (de exemplu culturi de micobacterii) firul se descarcă, înainte de înroșire, într-un flacon cu nisip spălat și alcool de 96°C. Astfel se evită împrăștierea pe masă de particule infecțioase la introducerea firului în flacără. Alternativ, se folosește un bec Bunsen cu flacăra înconjurată de un cilindru din sticlă de borosilicat.
9. Se verifică dacă omogenizatoarele folosite nu elimină aerosoli în cursul funcționării. Se efectuează toate omogenizările, inclusiv cele în mojar sau tub Griffith, pe un pătrat de 40/40 cm din hârtie de filtru îmbibată cu soluție dezinfectantă (vezi 2.2.2).
10. Se asigură permanent la locul de lucru un recipient cu soluție dezinfectantă activă (vezi 2.3.1).
11. Se dezinfectează masa și suprafețele de lucru la terminarea activității și după orice vărsare de produs infecțios sau de câte ori se suspectează o contaminare accidentală.
12. La spargerea accidentală a unui recipient cu cultură sau produs patologic, locul se acoperă cu o pânză și se toarnă deasupra o soluție dezinfectantă. Se lasă pe loc 30 minute. Măinile se protejează cu mănuși și, folosind un cardon rigid, se trag resturile pe un fâraș pentru autoclavare.
13. La fiecare loc de lucru se folosesc:
 - găleți cu capac (sau pungi fixate în găleți) pentru colectarea separată a materialelor reutilizabile și de unică folosință contaminate; acestea se înlocuiesc și se autoclavează zilnic;
 - borcane cu soluție dezinfectantă pentru pipete și mici obiecte reutilizabile, care se golesc zilnic, pentru decontaminare în continuare, și se toarnă soluție dezinfectantă proaspătă.
14. Nici un material contaminat după folosire nu părăsește laboratorul înainte de a fi sterilizat.
15. Microorganismele din grupul III de risc se manipulează numai dacă laboratorul este autorizat și numai în incinte de siguranță.
16. Pentru prelevarea și transportul probelor se folosesc numai recipiente rezistente, de preferat incasabile, bine închise.
17. Pentru expedierea prin poștă se ambalează și se etichetează materialul infecțios conform instrucțiunilor O. M. S. (1983), reglementărilor poștale naționale și internaționale.

Barierile secundare protejează personalul de microorganisme scăpate prin barierele primare.

1. În tot timpul activității se poartă halat, șorț și capelină de protecție curate, corect încheiate și legate. Echipamentul de protecție se păstrează separat de hainele și lenjeria pentru exterior.

La manipularca probelor provenite de la bolnavi cu hepatită sau SIDA sau care conțin alte microorganisme din grupul III de risc se poartă șorț din plastic peste lenjeria de protecție și se îmbracă mănuși chirurgicale din cauciuc.

2. Se dezbracă și se lasă la locul de lucru echipamentul de protecție ori de câte ori ne deplasăm în alte zone de activitate (vestiar, birou, cantină etc.).

3. Se spală mâinile după manipularea materialelor infecțioase și înainte de a părăsi locul de lucru. Este de dorit, pentru aceasta, o chiuvetă separată de cea de la masa de lucru.

4. Se protejează sub pansament hidrofob orice soluție de continuitate de pe tegumentul expus (abraziuni, zgârieturi, tăieturi).

5. Tot personalul se supune controlului medical periodic.

6. Se raportează șefului de laborator și cabinetului medical orice boală intercurrentă. Poate fi o infecție profesională.

7. Se comunică aceluiași autorități:

- sarcina imediat după ce survine; poate fi contraindicată manipularea anumitor microorganisme;

- eventualele tratamente cu steroizi sau medicamente imunosupresive; pot fi o contraindicație pentru continuarea activității în mediul cu risc infecțios.

8. Tot personalul urmează să fie supus vaccinărilor programate de conducerea unității.

9. În laboratoarele unde se manipulează bacilii tuberculozei personalul trebuie să fie vaccinat BCG sau controlat tuberculinopozitiv și supus anual controlului radiologic preventiv.

Barierelor terțiare reunesc echipamente și facilități de protecție suplimentară a personalului și prevenție a răspândirii agenților infecțioși în afara laboratorului: incintele de siguranță microbiologică, controlul curenților de aer creați prin instalațiile de ventilație și încălzire, filtrele exhaustoarelor de aer, instalațiile de neutralizare a apelor reziduale.

1.5.5. Incintele de protecție microbiologică

Incintele de securitate microbiologică au rolul de a capta și reține aerosolii infecțioși, care apar în cursul unor manipulări, protejând astfel personalul de inhalarea acestora. Se împart în clasele I, II și III. Cele din clasele I și II se folosesc pentru manipularea microorganismelor din grupul III de risc în laboratoarele clinice și în laboratoarele cu regim restrictiv, iar cele din clasă III pentru manipularea microorganismelor din grupul IV de risc. Operatorul lucrează cu mâinile și antebrațul în interiorul incintei și observă mișcările printr-o fereastră.

În incinta de clasă I aerul, pus în mișcare de un ventilator, pătrunde frontal și antrenează aerosolii printr-un filtru, după care este eliminat în atmosferă, unde eventuale particule nereținute de filtru sunt făcute inofensive prin diluție. Incinta este eficientă la un flux al aerului cu minimum 0,75 m/s. Filtrele trebuie schimbate când fluxul de aer scade sub această viteză. Un indicator de flux și un avertizor monitorizează funcționarea incintei.

Incinta de clasă II asigură recircularea prin filtre a 70% din aer, încât suprafața de lucru este scăldată cu aer practic steril. Aproximativ 30% din aer este eliminat în atmosferă complet debarasat de aerosoli și este înlocuit cu aer din cameră antrenat spre filtrele de la intrarea incintei fără a ajunge ca atare în aria de lucru. În lipsa unei boxe cu flux laminar de aer, pentru turnarea aseptică a unor medii de cultură, se poate folosi o incintă de siguranță de clasă II.

Incinta de clasă III este complet închisă. Operatorul își introduce mâinile în aria de lucru prin mănuși fixate etanș la aparat. Aerul este admis și evacuat prin filtre.

La amplasarea incintei de securitate microbiologică în încăperi trebuie evitați curenții de aer creați de circulația personalului, de ușă sau fereastră. Amănunte privind verificarea fluxului de aer, schimbarea filtrelor și dezinfecția acestor incinte pot fi găsite în cărțile tehnice însoțitoare.

Pentru o funcționare eficientă, în incintă se introduc numai materialele strict necesare. Manipulările se fac în mijlocul ariei de lucru. Sunt interzise surse de căldură (flacăra, microincineratoare), pentru că perturbă fluxul de aer; se lucrează cu anse dispozabile din material plastic. Măinile se scot din incintă numai după 2—3 minute de la terminarea lucrului, interval necesar aspirării aerosolilor, și, imediat, sunt spălate până la cot, având în vedere o contaminare posibilă în cursul lucrului.

1.5.6. Regimul substanțelor toxice, corozive și inflamabile

Toate flacoanele care conțin asemenea substanțe, ca și locurile de depozitare a lor, vor fi marcate prin etichete cu însemnele convenționale categoriei (toxic, inflamabil). Instrucțiuni suplimentare vor fi afișate după caz (de exemplu, fumatul și flacăra deschisă interzise). În rețetele pentru prepararea reactivilor, asemenea ingrediente vor fi semnalate cu mențiunea «precauție».

1.5.7. Aspecte organizatorice

Accesul la orice activitate în laboratorul de microbiologie este condiționat de însușirea, verificată, a instrucțiunilor privind regimul antiepidemic specific. Șeful laboratorului poate delega un subordonat pentru realizarea programului de securitate a activității în diferitele compartimente ale laboratorului, dar rămâne unic responsabil pentru eficiența lui și pentru eventuale incidente și accidente.

2

STERILIZAREA, DEZINFECȚIA ȘI CONSERVAREA

Sterilizarea este distrugerea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor, inclusiv a sporilor;

Dezinfecția este distrugerea formelor vegetative ale microbilor patogeni, dar nu obligator și a sporilor, din substanțe sau de pe suprafețe, care încetează astfel a mai fi vehicol al infecției.

Conservarea are două aspecte:

- unul privește prezervarea unor substanțe (alimente, medicamente, cosmetice, reactivi biologici) de degradarea microbiană;

- altul privește păstrarea viabilă a unor microbi în vederea studierii lor (conservarea unor prelevate patologice) sau a utilizării lor repetate la nevoie (tulpini de referință).

2.1. STERILIZAREA

În laboratoarele de microbiologie sterilizarea se obține prin tehnici bazate pe următorii agenți:

- căldură uscată:

- încălzirea la roșu,

- flambarea,

- incinerarea,

- aer cald;

- căldură umedă:

- peste 100°C (autoclavare);

- la sau sub 100°C (tyndalizare);

- filtrare.

Sterilizarea chimică prin oxid de etilen, utilă pentru chirurgie și stomatologie, nu este justificată în microbiologie.

2.1.1. Sterilizări prin căldură uscată

Încălzirea la roșu este indicată pentru firul drept, ansa și spatula de însămânțare.

Flambarea, adică infierbântarea obiectului de sterilizat prin trecere repetată în flacără timp de câteva secunde, este *indicată* pentru capilarul pipetelor Pasteur, gura eprubetelor și flacoanelor (figura 2.1). Aceste tehnici sunt *contraindicate* pentru sterilizarea obiectelor voluminoase care se încălzesc și se răcesc prea încet pentru a fi utilizate imediat (pipete gradate etc.) sau pe care căldura flăcării le degradează (ace de seringă, instrumentar chirurgical etc.).

Incinerarea este *indicată* pentru sterilizarea materialelor cu unică folosință contaminate prin utilizarea în laborator.

Sterilizarea prin aer cald. *Indicații:* obiecte de laborator din sticlă (eprubete, flacoane, pipete) sau porțelan (mojare, pistile), seringi Luer din sticlă, instrumentar chirurgical, substanțe grase, pulberi termostabile. *Contraindicații:* soluții apoase, obiecte din cauciuc sau cu garnituri din cauciuc, seringi din sticlă cu metal, țesături și vată din bumbac sau fibră sintetică, materiale contaminate din laborator.

Sterilizarea prin aer cald se realizează în etuvă la 160—180°C timp de o oră. Timpul de sterilizare crește

peste o oră în cazul ambalajelor voluminoase sau obiectelor și substanțelor care se încălzesc greu (tabelul 2.1).

Etuva este o incintă cilindrică sau paralelipidică cu pereți dubli, din tablă, termoizolați. Rezistențele electrice și un termostat permit menținerea constantă a temperaturii de sterilizare. Un sistem de ventilație pune în mișcare aerul în interiorul incintei pentru uniformizarea temperaturii. Obiectele de sterilizare se așază în etuvă pe rafturi din sită metalică (figura 2.2).

Procedura:

1. Se așază obiectele pregătite pentru sterilizare (vezi mai jos) pe rafturi, fără a umple incinta până la refuz, respectând mici spații între ambalaje pentru circulația nestânjenită a aerului cald.

2. Se închide ușa aparatului, se deschid orificiile de ventilație și se conectează aparatul la rețeaua electrică. Etuvele mari au ventilator cu palete, care pornește o dată cu rezistențele electrice.

3. Se marchează timpul de sterilizare (conform tabelului 2.1) din momentul în care termometrul indică 160—180°C.

4. Se scot obiectele sterilizate numai după răcirea aparatului.

2.1.2. Sterilizări prin căldură umedă

2.1.2.1. Sterilizări la peste 100°C

Aceste sterilizări se fac în autoclave prin vapori sub presiune, care realizează 115°C la 0,5 atmosfere, 121°C la o atmosferă.

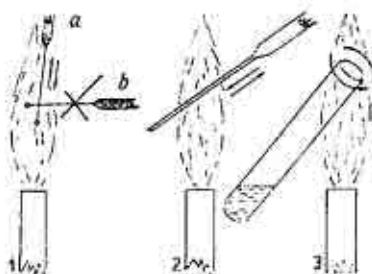


Fig. 2.1. Sterilizarea prin ardere în flacără: 1 — încălzirea la roșu: a — poziția corectă, b — poziția incorectă a ansei în flacără; 2 — flambarea capilarului pipetei Pasteur; 3 — flambarea gurii unei eprubete

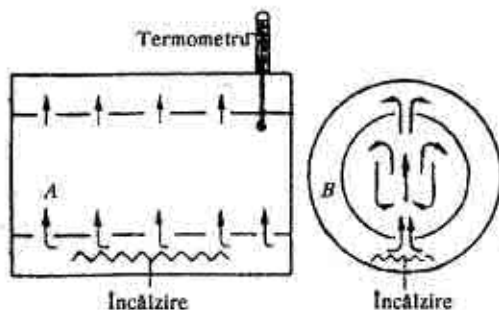


Fig. 2.2. Etuva pentru sterilizarea prin aer cald, schemă: A — secțiune longitudinală; B — secțiune transversală, săgețile marchează circulația aerului cald în incinta de sterilizare

Tabelul 2.1. Parametrii sterilizării prin aer cald și prin vapori de apă sub presiune

Materialul și volumul în care este supus sterilizării	Tempul ¹ de egalizare a temperaturii	Tempul ¹ de omorâre a microbilor	Tempul ¹ total al operației ²
<i>Sterilizare în etuvă la 160—180°C</i>			
Sticlărie, instrumentar metalic în ambalaje cu volum redus	35	25	60
Ibid., în ambalaje voluminoase: seringi Luer din sticlă ambalate în tuburi; pulberi în cutii Petri în strat mai subțire de 0,5 cm și nu mai mult de 10 g/cutie.	95—125	25	120—150
Ulei (maximum 85% din volumul recipientului):			
■ în fiole până la 20 ml	25	25	50
■ în flacoane de 100 ml	45	25	70
■ în flacoane de 300 ml	50	25	75
<i>Autoclavare la 121°C</i>			
Soluții apoase (maximum 75—80% din volumul recipientului):			
■ volum de 10 ml în eprubete	0	18	18
■ volum de 500 ml	2—7	18	20—25
■ volum de 1000 ml	7—12	18	25—30
■ volum de 2000 ml	17—27	18	35—45
¹ Tempul măsurat în minute. ² Măsurat din momentul în care presiunea din incinta de sterilizare a atins valoarea selectată.			
NOTĂ: Este contraindicat a steriliza concomitent volume mari cu volume mici, pentru că la aceeași durată de expunere volumele mici se supraîncălzesc, iar cele mari pot rămâne nesterilizate (e. g. la o expunere de 25 minute).			

feră și 134°C la 2 atmosfere. Această corespondență temperatură—presiune a vaporilor de apă se realizează numai într-o incintă complet lipsită de aer. Prezența aerului compromise sterilizarea. Vaporii de apă, mai ușori, încălzesc partea superioară a incintei, iar aerul, mai greu, rămâne în partea inferioară cu temperaturi insuficiente pentru sterilizare. Parametrii sterilizării la autoclavă sunt prezentați în tabelul 2.1.

Autoclava este un cazan cu pereți rezistenți, în care, după închiderea etanșă cu un capac masiv, presat cu buloane sau cu un sistem cabestan, vaporii de apă se comprimă la presiunea necesară sterilizării.

A. *Autoclavele cu perete simplu* pot fi verticale sau orizontale. Sunt cele mai indicate pentru sterilizarea soluțiilor și materialului contaminat din laborator. Aici se mai sterilizează sticlăria pentru culturi de celule și aparatele de filtrare.

La acest tip de autoclave vaporii provin din apa aflată în cazanul de presiune și pătrund în camera de sterilizare de jos în sus prin suportul de tablă perforată pe care se așază obiectele de sterilizat. Un manometru controlează presiunea din interiorul cazanului. Un robinet de vaporii, aflat în partea superioară a autoclavei, pune în legătură cazanul cu exteriorul. Un al doilea robinet, aflat la partea inferioară, permite evacuarea apei din cazan. O supapă de siguranță permite evacuarea vaporilor, când presiunea lor depășește limita de securitate. Cazanul este cuprins într-un manșon de tablă groasă, care la partea inferioară formează un locaș pentru adaptarea sursei de căldură.

Procedura:

1. Se toarnă apă în cazan, prin incinta de sterilizare, până la 2—3 cm sub nivelul suportului.

2. Se așază pe suport obiectele de sterilizat în ambalajul lor. Ambalajele sunt: flacoane, eprubete, coșuri din sârmă pentru eprubete și flacoane mici, cutii, casolete, hârtie pentru împachetarea unor obiecte, găleți sau saci din plastic termorezistent pentru materialul de laborator contaminat. Flacoanele se introduc cu capacul semiînșurubat, cutiile cu capacul întredeschis, casoletele cu orificiile deschise, gălețile fără capac.

3. Se închide etanș capacul strângând buloanele diametral opus, mai întâi cu mâna, apoi complet cu o pârghie.

4. Se conectează sursa de căldură.

5. Se deschide robinetul pentru evacuarea aerului. O dată cu vaporii de apă, prin robinetul deschis, se evacuează și aerul din incinta de sterilizare, asigurând astfel o convecție puternică: vaporii în contact cu obiectele reci le cedează căldura și se condensează; presiunea lor tinde să scadă și atrage altă cantitate de vaporii care transportă și cedează căldura ș. a. m. d. Aprecierea corectă a evacuării aerului se face cufundând într-un vas cu apă un tub de cauciuc adaptat la robinetul de vaporii. Aerul este complet evacuat din incinta de sterilizare, când încetează a mai barbota prin apă.

6. Se închide robinetul de evacuare a aerului.

7. Când presiunea ajunge la valoarea aleasă, se reglează sursa de căldură, pentru a menține această presiune pe toată durata timpului de sterilizare (tabelul 2.1).

8. Se intrerupe sursa de căldură și se lasă aparatul să se răcească până când manometrul indică zero (presiunea atmosferică). Numai în acest moment se deschide lent robinetul de vaporii, apoi capacul. Nu se deschide autoclava cât presiunea este peste zero, pentru că lichidele fierbinți vor fierbe exploziv și pot sparge flacoanele.

9. Se lasă materialele pentru uscare în autoclava deschisă. Când materialele ajung la cca 80°C pot fi scoase. Aceasta durează în funcție de volumul ambalajelor și vâscozitatea soluțiilor. Flacoanele mari cu mediu de cultură agarizat pot necesita și câteva ore.

Dezavantaje: În ambalaje pot persista pungi de aer, precum și o cantitate mare de condens în cursul sterilizării. Uscarea dificilă după sterilizare impune o serie de precauții (e. g. evitarea contactului obiectelor ambalate în hârtie cu suprafețe nesterile până la perfectă uscare a ambalajului).

B. *Autoclavele cu manta de abur* sunt concepute pentru sterilizarea materialelor chirurgicale din bumbac, obiectelor și instrumentelor din cauciuc, instrumentarului metalic, seringilor cu componente metalice etc., pentru că asigură uscarea rapidă și perfectă a materialelor sterilizate. Pot fi verticale sau orizontale.

În lipsa unei autoclave cu perete simplu, pot fi utilizate și pentru sterilizarea soluțiilor sau a altor materiale din laborator.

■ *Autoclava verticală cu manta de abur.* Vaporii de apă provin din rezervorul de apă plasat în partea inferioară a cazanului de presiune și pătrund în incinta de sterilizare, de sus în jos, după ce au trecut prin mantaua de abur și au încălzit-o. Această autoclavă prezintă

următoarele accesorii în plus față de autoclava cu perete simplu: o pâlnie de alimentare și o nivelă pentru controlul apei din sursa de vapori, robinete care pun în comunicare sursa de vapori cu aceste piese, un robinet de evacuare a aburului și un robinet prin care se elimină apa de condens acumulată în partea declivă a incintei de sterilizare.

Procedura:

1. Se deschid robinetele pâlniei de alimentare cu apă și ale nivelei.
2. Se toarnă apă în rezervor până la marca indicată pe nivelă.
3. Se așază în incinta de sterilizare materialele în ambalajele lor.
4. Se închide etanș capacul cazanului.
5. Se conectează sursa de căldură.
6. Se deschide robinetul pentru evacuarea aerului și se închid toate celelalte robinete ale aparatului.

Pentru sterilizarea soluțiilor se procedează în continuare ca la autoclava cu perete simplu (etapele 5—9). În acest caz nu se operează deloc nici cu robinetul de evacuare a aburului, nici cu cel de evacuare a condensului (acestea rămân închise).

Pentru sterilizarea materialelor chirurgicale și a seringilor, după epuizarea timpului de sterilizare:

- se intrerupe sursa de căldură,
- se deschide robinetul de evacuare a aburului și, când presiunea a coborât la 0,5 atmosfere,
- se deschide robinetul pentru evacuarea condensului, iar când presiunea a coborât la zero,
- se deschide capacul autoclavei,
- se scot caseletele și se închid orificiile numai după ce s-au răcit în autoclavă. În caz contrar, prin răcire în exterior, până la o treime din volumul lor va absorbi aer atmosferic contaminat.

■ *Autoclava orizontală cu evacuare gravitațională a aerului* poate fi cilindrică sau rectangulară. Ușa se închide cu sistem cabestan (figura 2.3).

Vaporii proveniți din sursă exterioară cu mare presiune trec spre manta și incinta de sterilizare printr-un regulator de presiune.

Aburul este obligat să pătrundă prin partea superioară a incintei de sterilizare, forțând astfel aerul și condensul să se scurgă gravitațional prin conducta de la partea inferioară a incintei, care este prevăzută cu site pentru reținerea impurităților.

Valvele termostactice (capcane pentru abur pur) asigură reținerea în incinta de sterilizare și manta numai a aburului pur. Ele se deschid când temperatura scade cu peste 2°C sub cea a aburului pur evacuând automat aerul și condensul și se reînchid când temperatura revine la mai puțin de 2°C față de cea a aburului pur.

Un termometru indică temperatura aburului din canalul de scurgere deasupra capcanei de abur, cât mai aproape de partea inferioară a incintei de sterilizare.

Un sistem de vacuum favorizează uscarea finală a materialelor sterilizate, iar un sistem de răcire previne fierberea violentă a lichidelor și grăbește scăderea presiunii la sfârșitul sterilizării.

Procedura:

1. Prin admisie de abur, se încălzește mantaua până la temperatura de sterilizare, reducând astfel formarea condensului în incinta de sterilizare și grăbind uscarea finală.

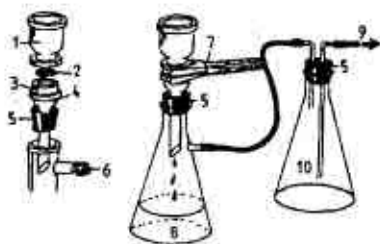


Fig. 2.3. Membrană filtrantă montată în dispozitiv de filtrare prin presiune negativă: 1 — pălnie; 2 — membrană filtrantă; 3 — suportul membranei (sticlă poroasă); 4 — bază (metal sau sticlă); 5 — dop de cauciuc; 6 — dop de vată; 7 — clemă; 8 — fluidul filtrat; 9 — spre pompa de vid; 10 — capcană

2. Se plasează în incinta autoclavei materialele de sterilizat și se închide ușa etanș.

3. Se deschide accesul vaporilor de apă în incinta de sterilizare cu valva canalului de evacuare a aerului și condensului deschisă.

4. Se urmărește termometrul canalului de evacuare a incintei de sterilizare. Când atinge temperatura selectată pentru sterilizare (uzual 5—10 minute), se marchează timpul de sterilizare conform indicațiilor din tabelul 2.1. Indicațiile manometrului sunt mai puțin fidele pentru că nu atestă prezența aburului pur în incintă.

NOTĂ: Se curăță zilnic sitele canalului de evacuare, pentru a-l asigura permeabilitatea perfectă.

5. La epuizarea timpului de sterilizare se oprește accesul vaporilor în incinta de sterilizare, dar se continuă circulația lor prin manta.

La sterilizarea soluțiilor se lasă presiunea să scadă spontan până la zero în incinta de sterilizare. Pierderea de căldură prin ușa fără manta a autoclavei

realizează scăderea presiunii în 10—30 minute, în raport cu volumele de lichid sterilizate. La volume mari de medii agarizate scăderea presiunii poate dura mai mult de o oră, ceea ce poate degrada mediile termosensibile. Autoclavele moderne sunt prevăzute cu sisteme de răcire a flacoanelor fără fierbere explozivă. În lipsa acestora, la sfârșitul operațiunii, răcirea poate fi grăbită prin deschiderea foarte lentă a valvei de evacuare a incintei.

La sterilizarea materialelor chirurgicale și seringilor:

- Scăderea presiunii în incinta de sterilizare este provocată prin deschiderea imediată a valvei de evacuare. Uscarea poate fi grăbită prin acționarea sistemului de vacuum.

- Deschiderea autoclavei se face numai după ruperea vidului din incinta de sterilizare prin deschiderea valvei de acces a aerului filtrat. Casolettele trebuie să se răcească în autoclavă aproape de temperatura camerei.

Protecția operatorului

1. Nu se deschide capacul autoclavei înainte de coborârea presiunii la zero și deschiderea lentă a robinetului de evacuare a incintei. Volumele mari de soluții pot avea însă peste 100°C și la contactul cu aerul la temperatura camerei pot exploda.

2. Pentru deschiderea capacului, se utilizează mănuși protectoare termoizolante și fața se protejează cu un vizor care acoperă de asemenea pielea gâtului și pieptul.

2.1.2.2. Tyndalizarea sau sterilizarea fracționată

Tyndalizarea ori sterilizarea fracționată evită încălzirea la temperaturi de peste 100°C.

Principiu: În medii care permit germinarea sporilor, încălzirile repetate omoară atât formele vegetative existente inițial, cât și pe cele germinate din spori în intervalele dintre încălziri.

Indicații: Sterilizarea unor medii de cultură, a alimentelor.

Necesar: Autoclava pentru tyndallizare la 100°C, în vapori fluenți (autoclavare cu robinetul pentru vapori deschis), baie de apă sau de nisip pentru tyndallizări sub 100°C.

Procedura: Substanțele de sterilizat, în volume mai mici de un litru, se mențin 30—60 minute, 3—8 zile consecutiv, la temperatura impusă de compoziția lor. În intervalele dintre încălziri recipientele cu substanțele supuse sterilizării se mențin la temperatura camerei pentru germinarea sporilor.

2.1.3. Filtrarea

Filtrarea este trecerea unui fluid printr-un corp poros — filtru. Filtrele cu porozități convenabile pot debarasa de microorganisme fluidul filtrat, acestea fiind reținute mecanic și electrostatic în porii filtrului. Metoda este indicată pentru sterilizarea aerului, a unor medii de cultură pentru microbi, a medicamentelor care nu suportă încălziri. Filtrele clasice, din porțelan sau pământ de infuzorii, cu forma unor lumânări goale pe dinăuntru și închise la un capăt (bujii filtrante), plăcile filtrante din azbest impregnat cu caolin (filtre Seitz) sau sticlă poroasă (filtre Schott), sunt astăzi înlocuite prin membrane filtrante din acetat de celuloză cu porozități între 8 și 0,025 μm . O membrană cu porozitatea de 0,22 μm reține toate bacteriile. Filtrarea se face prin aspirație (figura 2.4) sau prin presiune pozitivă (e. g. membrana filtrantă adaptată la o seringă). Pentru a evita colmatarea porilor, suspensiile cu mare densitate a particulelor sunt prefiltrate printr-un material fibros sau granular.

2.1.4. Sterilizarea chimică

Pentru sterilizarea chimică se folosesc gaze. Mai cunoscut este *oxidul de etilen*, un gaz incolor, cu miros ușor eterat (detectabil la concentrații de 700 ppm), ușor solubil în apă și inflamabil (pericol de explozie la concentrații mai mari de 3% în spații închise). Toxicitatea este moderată: după inhalare acută apar greață, vărsături, dezorientare mentală (concentrația maximă admisă în zona de lucru e de 50 ppm), iar soluțiile în contact cu tegumentul au efect vezicant (e. g. după vărsare pe lenjerie).

Indicații: Sterilizarea echipamentului de plastic termosensibil se efectuează în laboratoarele de microbiologie. Mai larg folosit este însă în serviciile de endoscopie (sterilizarea cateterelor și componentelor termosensibile ale endoscoapelor), de chirurgie sau de stomatologie.

Se utilizează în amestec cu 15% CO_2 (pentru a preveni explozii). În incinte etanșe, la 55—60°C și 40% umiditate relativă, în concentrație de 450—800 mg/l oxidul de etilen asigură sterilizarea în interval de 2,5—3 ore. Penetrarea în porozități este slabă.

Alt gaz utilizat pentru sterilizări este β -propiolactona. Formaldehida, deși are bune efecte sporocide, fiind iritantă, se utilizează mai mult ca dezinfectant (vezi mai jos).

2.1.5. Controlul eficienței sterilizării

Se face prin indicatori fizici (manometru, termometru), chimici (tabelul 2.2) și biologici. *Indicatorii fizici și chimici* nu dau indicații asupra timpului cât s-a menținut temperatura. *Indicatorii biologici*, tuburi cu fire de bumbac impregnate cu spori bacterieni

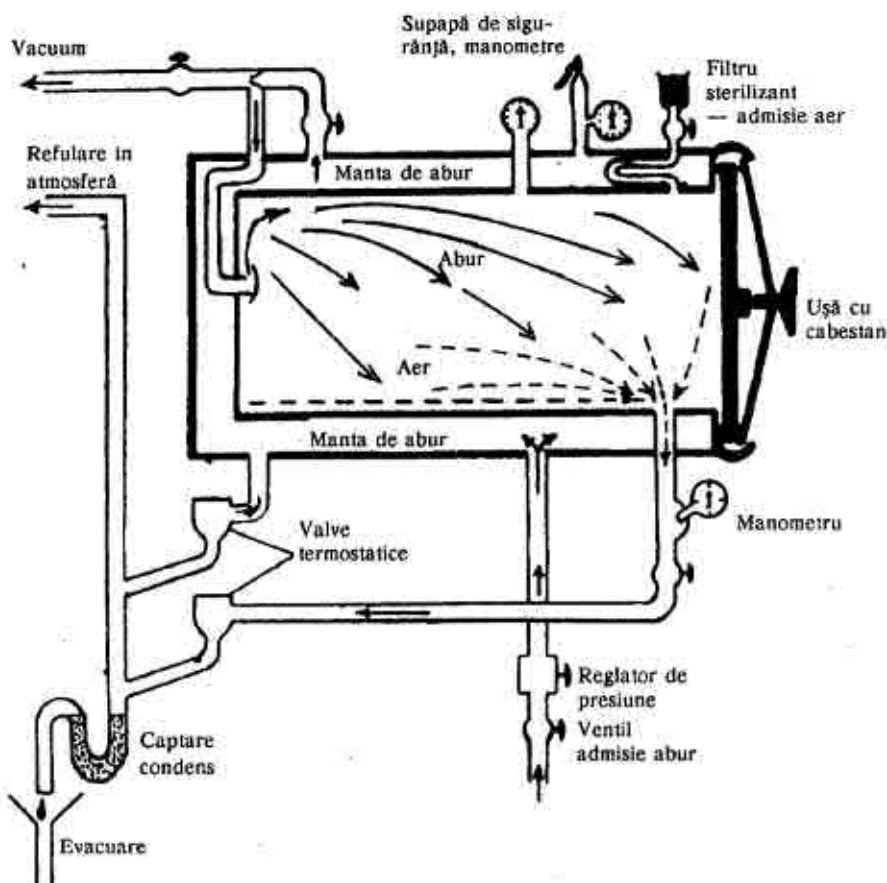


Fig 2.4. Autoclava orizontală cu manta de abur și evacuare gravitațională a aerului, secțiune schematică

și uscate, au o mare fidelitate. După sterilizare se testează viabilitatea sporilor prin însămânțarea lor în medii de cultură adecvate.

Tuburi cu indicatori chimici sau biologici se plasează la diferite niveluri ale incintei de sterilizare, în centrul ambalajului. Uzual sterilizarea fiecărui lot de materiale se testează prin indicatori fizici și chimici, iar săptămânal aparatele sunt verificate prin indicatori biologici.

Tabelul 2.2. Indicatori chimici pentru sterilizarea prin căldură

Pentru autoclavă		Pentru etuvă	
substanță	punct de fuziune	substanță	punct de fuziune
Floare de sulf	115°C	Tiouree	180°C
Acid benzoic	121–122°C	Sulfametoxipiridazină	180–182°C
Fenacetină	134°C		
1,3,5-Tribromfenol	120°C		

2.1.6. Prezervarea sterilității materialelor

Se face diferențiat în funcție de natura materialului și metoda de sterilizare.

Eprubetele și flacoanele se sterilizează prevăzute cu dopuri de vată și tifon, protejate cu capșon de hârtie sau foiță de aluminiu. Foarte eficientă este protejarea prin capac înșurubat.

Tuburile pentru pipete Pasteur se sterilizează cu extremitățile înfundate cu filtru de vată. Pipetele gradate se sterilizează prevăzute cu filtru de vată, învelite individual în benzi de hârtie pergament sau grupate în cutii din tablă de aluminiu prevăzute cu capac și amortizor din vată de sticlă pentru protecția vârfurilor.

Plăcile Petri se sterilizează învelite, individual sau grupate, în hârtie pergament. Mojarale și pistilele se învelesc separat în hârtie.

Umezirea ambalajelor de hârtie, a dopurilor și filtrelor din vată compromite sterilitatea. Sporii fungici omniprezenți în pulberile de contaminare a dopurilor și ambalajelor germinează în condiții de umezeală, iar hifele lor se dezvoltă în profunzime, pătrund și eliberează spori care contaminatează conținutul.

Instrumentele chirurgicale se sterilizează la etuvă în cutii metalice speciale.

Inventarul chirurgical din bumbac se sterilizează la autoclavă în cazolete (cutii cilindrice din tablă prevăzute cu capac și orificii prin care pătrund vaporii de apă în cursul autoclavării și care se obturează la scoaterea din autoclavă).

Seringile cu armătură metalică (Record, Luer) se sterilizează la autoclavă cu manta de abur, demontate, fiecare seringă alături de pistonul ei și 1—2 ace în cutie proprie pentru a evita schimbarea pistoanelor între seringi. Seringile Luer din sticlă se sterilizează la etuvă cu acul montat și introduse într-un tub de sticlă astupat cu dop de vată. Este o greșeală sterilizarea seringilor Luer din sticlă la autoclavă: uleiul cu care este gresat pistonul pentru etanșizarea seringii nu permite udarea suprafeței și face inefficientă sterilizarea.

2.2. DEZINFECȚIA

Pentru dezinfecție în laboratorul de microbiologie se utilizează în principal agenți chimici, substanțe cu efect antimicrobian nespecific. Asemenea substanțe le numim *dezinfecțante*, dacă din cauza efectelor iritante sau toxice le putem aplica numai pe suprafețe inerte, sau *antiseptice*, dacă toxicitatea mai redusă permite aplicarea lor pe tegument, unele mucoase sau plăgi. Uneori, aceeași substanță (e. g. cloramina B) în soluții diluate este antiseptic, iar în soluții mai concentrate dezinfecțant.

Agenții chimici de dezinfecție diferă prin eficiență antimicrobiană, activitatea în prezența substanțelor organice și toxicitate. Cele mai sensibile la substanțele dezinfecțante sunt organismele în formă vegetativă (bacterii, fungi, protozoare) și virusurile cu înveliș lipidic; relativ rezistente sunt micobacteriile și virusurile nede, sporii fiind foarte rezistenți (tabelul 2.3).

2.2.1. Precauții privind siguranța dezinfecției chimice

■ *Necesitatea diferențierii «curat» de «murdar».* Prezența substanțelor organice reduce eficiența antimicrobiană a dezinfecțantelor. De aceea în regimul lor de utilizare diferențiem condiția «curat» de «murdar». Prin «curat» înțelegem lipsa substanțelor or-

Tabelul 2.3. Proprietățile unor substanțe dezinfectante uzuale (după C. H. Collins, 1988)

Substanță	Active contra				
	Fungi	Bacterii		Micobacterii	Spori
		G+	G—		
Fenoli	+++	+++	+++	++	—
Hipocloriți	+	+++	+++	++	++
Alcooli	—	+++	+++	+++	+++
Formaldehidă	+++	+++	+++	+++	+++ ¹
Glutaraldehidă	+++	+++	+++	++	+++ ²
Iodofori	+++	+++	+++	++	+
Compuși de amoniu cuaternar	+	+++	++	—	—

¹Peste 40°C +++ = bun NP = neprecizat
²Peste 20°C ++ = mediu G = gram
 + = slab C = cationic
 — = deloc A = anionic

ganice, care poate fi realizată prin spălarea suprafețelor cu apă și săpun sau detergenți. Prin «murdar» înțelegem prezența substanțelor organice (e. g. lenjerie murdară, suprafețe contaminate cu sânge, excreții, produse patologice, culturi microbiene). Frecvent nu putem realiza spălarea înaintea dezinfecției. Ca atare pentru dezinfecție vom utiliza soluții antimicrobiene mai concentrate în circumstanța «murdar» decât în circumstanța «curat».

Din aceleași rațiuni, nu se introduc mâinile în soluția antiseptică, ci se toarnă soluția antiseptică peste mâini.

■ *Necesitatea penetrării agentului dezinfectant în anfractuozitățile și porii echipamentului contaminat impune o bună etalare și dispersie a echipamentului expus la agenții în formă gazoasă (e. g. formaldehidă), scufundarea completă cu îndepărtarea bulelor de aer în soluțiile dezinfectante.*

■ *Necesitatea testelor de eficiență a dezinfectantelor. Testări efectuate de producători și de laboratoare de referință atestă capacitatea antimicrobiană a dezinfectantelor și stabilitatea soluțiilor.*

Coeficientul fenolic arată cu cât este mai activ un compus fenolic în comparație cu fenolul pur. Testul Rideal-Walker determină coeficientul fenolic cu substanțe pure, iar testul Chick-Martin îl determină în prezența de substanță organică. Coeficientul fenolic se exprimă printr-o cifră urmată de inițialele R.M. sau C.M., care precizează condițiile de testare. Substanțele cu coeficienți fenolici mai mari au efect antimicrobian mai mare. Coeficientul fenolic C.M. este mai mic decât cel R.M. din cauza testării în prezența de substanță organică.

Testul de capacitate Kelsey-Sykes este mai adecvat diversității actuale a substanțelor dezinfectante. Testul reproduce circumstanțele de utilizare «curat» și «murdar» prin adă-

Inactivate de				Toxicitate		
proteine	alte substanțe organice	apă dură	detergenți	piele	ochi	pulmoni
+	+	+	C	+	+	-
+++	+	+	C	+	+	+
+++ ¹	+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+	+
NP	+	+	-	+	+	+
+++	+	+	A	+	+	-
+++	+++	+++	A	+	+	-

ugarea de substanță organică la diluțiile testate. Testul Kelsey-Sykes precizează concentrațiile de dezinfectant indicat pentru situațiile «curat» și «murdar». Amănunțele privind testarea depășesc scopurile acestui capitol. Cei interesați pot consulta lucrările de referință ca: Kelsey, J. C., Maurer, I. M.: *An improved Kelsey-Sykes test for desinfectants. Pharmaceutical Journal*, 1974, 213:528—536.

Testarea dezinfectantelor în condițiile de utilizare revine fiecărui laborator și se impune ca test periodic.

Principiu: Prezența unui număr redus de microorganisme viabile în soluția unui dezinfectant este posibilă, depășirea unei anumite limite indică însă deficiențe în prepararea, manipularea sau conservarea soluției.

Necesar:

- pipete gradate de 1 ml sterile,
- flacoane de 25 ml sterile cu capac înșurubat,
- diluent neutralizant (tabelul 2.4),
- pipete Pasteur care picură 50 picături/ml,
- plăci cu agar nutritiv.

Procedura:

1. Se prelevă aseptice 1 ml soluție dezinfectantă din fiecare borcan sau găleată folosind pipete separate.

Prelevările se fac din containerele cu soluții stock diluate pentru utilizare, borcanele și containerele pentru echipament contaminat (pipete, lame de microscop, instrumente etc.), gălețile cu cârpa sau peria pentru podele etc.

2. Se transvazează fiecare probă de 1 ml soluție dezinfectantă în câte un recipient

cu 9 ml diluent neutralizant, marcat pentru identificarea probei, și se omogenizează.

3. În intervalul de cel mult o oră după omogenizarea probelor de dezinfectant, se

Taboul 2.4. Diluenții neutralizați pentru testarea dezinfectantelor în condiții de utilizare (după C.H. Collins și colab., 1989)

Diluent	Grup de substanțe dezinfectante
Bulion nutritiv	Alcooli Aldehide Hipocloriți Fenoli
Bulion nutritiv + + Tween 80 soluție 3% w/v	Hipocloriți + detergenți, Iodofori Fenoli + detergenți Compuși de amoniu quaternar

prelevă cu pipete Pasteur separate un mic volum din fiecare amestec dezinfectant — diluent neutralizat și se însămânțează în spoturi separate, câte 10 picături pe suprafața bine uscată a două plăci cu agar nutritiv.

4. Se incubează cele două plăci astfel:

■ Una timp de 3 zile la 32 sau 37°C. Bacteriile patogene cultivă optim la 37°C, dar celor afectate de dezinfectant le poate fi mai convenabilă temperatura de 32°C.

■ A doua timp de 7 zile la temperatura camerei pentru cultivarea bacteriilor saprofite și a fungilor.

5. Se numără coloniile dezvoltate pe spoturile de însămânțare.

Interpretare:

$$\begin{aligned} \text{Numărul microorganismelor/ml} \\ \text{soluție dezinfectantă} &= \frac{N \times D}{\text{volumul însămânțat}} \end{aligned}$$

unde:

N — număr de colonii;

D — factorul de diluție (inversul diluției);

volumul însămânțat = 10 picături \times 0,02 ml = 0,2 ml.

Deci dacă am numărat 6 colonii, în soluția dezinfectantă verificată au fost:

$\frac{6 \times 10}{0,2} = 300$ microorganisme viabile/ml. Peste 250 microorganisme viabile/ml indică o soluție dezinfectantă inefficient.

Protecția personalului. Multe dezinfectante sunt iritante pentru ochi, căile respiratorii, piele. La manipularea substanțelor stock pentru prepararea soluțiilor operatorul va purta, după caz, mănuși și ochelari de protecție (vezi 2.2.2.).

2.2.2. Dezinfectante uzuale în laboratoarele de microbiologie

Hipocloriți. Sunt comercializați ca soluții pentru uz industrial sau în laboratoare (100 000 ppm clor activ), sau pentru uz casnic (10 000 sau 50 000 ppm clor activ). Pentru uz casnic sunt de asemenea livrați hipocloriți în formă solidă, tabletată. Toate aceste

preparate pot fi utilizate în laborator dacă se ține cont de concentrația în clor activ. Au efect germicid asupra unei game largi de microorganisme: bacterii în formă vegetativă (inclusiv micobacterii), fungi, spori, virusuri. Activitatea antimicrobiană scade mult în prezența proteinelor, altor substanțe organice și maselor plastice. Detergenții îi inactivează.

Indicații: Dezinfecția suprafețelor, borcanelor pentru pipete și echipamentului mic contaminate

Circumstanța	Concentrația indicată a soluției dezinfectante, ppm clor activ
Suprafețe relativ curate	1 000
Borcane pentru pipete contaminate	2 500
Suprafețe contaminate cu sânge	10 000

Soluțiile rămân active 24 ore.

Contraindicații: Corodează metalele. Nu se aplică pe suprafețele metalice ale centrifugilor și aparatului supuse la solicitări mecanice.

Precauții: Efecte iritante, în funcție de concentrație, asupra pielii, ochilor, căilor respiratorii.

Derivații fenolici. Efectul germicid se limitează la bacterii în formă vegetativă (inclusiv micobacterii) și fungi, nu este afectat de proteine, dar eficiența scade pe suprafețele de cauciuc, lemn sau material plastic. Sunt ineficienți asupra sporilor și virusurilor nede.

Indicații: Dezinfecția suprafețelor, borcanelor pentru pipete și echipamentului mic contaminat. Soluțiile 1% sunt indicate pentru circumstanțe «curate», cele 2—5% pentru circumstanțe «murdare». Soluțiile se schimbă la 24 ore.

Precauții: Efect iritant posibil asupra ochilor și pielii.

Formaldehida este un gaz foarte iritant, stabil numai la temperaturi peste 80°C; la temperatura camerei polimerizează repede și formează pe suprafețe un depozit alb. Se comercializează sub două forme:

- paraformaldehida, polimer solid, alb cu miros ușor înțepător din cauza degajării de formaldehidă;

- formolul, soluție apoasă de 37—40% formaldehidă stabilizată cu 8—15% metanol contra polimerizării la temperaturi mai joase.

Efectul germicid puternic se extinde asupra tuturor microorganismelor, fără a fi inactivat de proteine sau detergenți.

Forme de utilizare și indicații:

1. **Forma gazoasă** este indicată pentru dezinfecția suprafețelor, echipamentului și efectelor care nu pot fi udate (saloane de spital, saltele, perne, păături, haine groase, cărți, lână etc.), instrumentarului termosensibil. Principala indicație în laboratorul de microbiologie este dezinfecția periodică a incintelor de securitate microbiologică.

Are efect antimicrobian mai puternic la temperaturi peste 20°C și umiditatea mai mare de 60% (cea optimă fiind de 80—90%). Se obține prin încălzirea formolului (1 volum formol + două volume apă în fierbător electric) sau paraformaldehidei (pe reșou electric). Concentrații maxime de 2 g formaldehidă/m³ se obțin, la 20°C, dar suficientă pentru dezinfecție este concentrația de 0,05 g/m³. Pentru dezinfecția unei incinte de securitate (cca 0,3—0,4 m³) sunt suficienți 25 ml formol sau 3—4 g paraformaldehidă, iar pentru

incăperi 15 ml formol/m³ aer.

Penetrabilitatea forme gazoase este redusă, deci suprafețele supuse dezinfecției trebuie bine etalate. Formaldehida fiind foarte iritantă, incintele de dezinfecat vor fi închise etanș. Paraformaldehida depusă pe suprafețele dezinfectate emite timp îndelungat vapori iritanți, ceea ce impune fie aerisire prelungită, fie neutralizarea paraformaldehidei prin vapori de amoniac.

2. *Soluții* cu 4% formaldehidă (formol diluat de 1/10) sau mai concentrate, până la 10%, sunt indicate pentru dezinfecția suprafețelor sau culturilor. Soluțiile 0,04—1% sunt folosite pentru inactivarea suspensiilor bacteriene aglutinabile.

Glutaraldehida are *efect antimicrobial* foarte bun (inclusiv asupra virusurilor hepatitelor B și C), neinfluențat de proteine. Se utilizează în concentrații de 2% activată în soluție alcalină (tamponată cu bicarbonat de sodiu la pH 7,5—8,5). Este *indicată* pentru dezinfecția suprafețelor metalice pe care nu le corodează. Deși este mai puțin iritantă decât formaldehida, contactul cu pielea și conjunctiva trebuie prevenit.

Detergenții cationici sunt compuși de amoniu quaternar activi asupra bacteriilor (mai ales grampozitive), mai puțin asupra fungilor și inactivi asupra micobacteriilor și sporilor. Sunt inactivați de proteine, alte substanțe organice, mase plastice, detergenți anionici și săpunuri. Soluțiile apoase de 1—2% sunt larg utilizate pentru spălarea (agenți tensioactivi de udare și spumânți) și dezinfecția suprafețelor. Nu corodează metalele, nu sunt toxici, nici iritanți.

Alcoolii utilizați pentru dezinfecție sunt etanolul și propanolul în soluții apoase de 70—80%. Au efect antimicrobial relativ lent și sunt ineficienți asupra fungilor și sporilor. Nu sunt inactivați de proteine sau detergenți, iar activitatea antimicrobială crește mult prin asociere cu hipocloriți (la concentrație finală de 2 000 ppm clor activ) sau cu formol (10% formol în alcool de 70%).

Sunt utilizați ca atare, mai bine în amestec cu hipocloriți sau formol, pentru dezinfecția suprafețelor și pentru echilibrarea cupelor de centrifugă. Alcoolii sunt iritanți pentru conjunctivă, dar nu afectează pielea normală.

Iodoforii (*iodo* = iod; *phor* = purtător, purtător de iod) sunt detergenți neionici din clasa propilenglicolilor, care complexează iodul și, în soluții apoase, îl eliberează lent cu efecte germicide asupra bacteriilor (inclusiv micobacteriile), fungilor, sporilor și virusurilor cu înveliș lipidic sau nude. Sunt însă inactivați de proteine și alte substanțe organice, mase plastice și detergenți anionici. În soluții apoase cu 75—150 ppm iod pot fi utilizați, în borcanele pentru pipete și echipament contaminat, pentru dezinfecția suprafețelor, iar soluțiile în 50% alcool cu 1 600 ppm iod au efecte sporocide și sunt utilizate pentru antiseptizarea mâinilor. Petele lăsate de iodofori pe piele și suprafețe sunt ușor îndepărtate cu o soluție de tiosulfat de sodiu.

La manipularea iodoforilor trebuie evitat contactul cu conjunctiva.

2.3. DECONTAMINAREA ȘI CIRCUITUL MATERIALELOR ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Este interzis ca materiale contaminate să părăsească laboratorul sau să pătrundă în ariile cu activitate «curată» din laborator.

Prima barieră de apărare antiinfecțioasă care se aplică este dezinfecția echipamentului contaminat de la masa de lucru, cât mai curând completată prin autoclavare sau incinerare finală. Culturile bacteriene nu trec prin dezinfecție, barieră cu eficiență greu de controlat în această condiție, ci trec direct la autoclavare.

2.3.1. Colectarea materialelor contaminate

Gălețile cu capac pentru colectarea recipientelor cu culturi sau resturi de prelevate patologice, trebuie să fie lipsite de fisuri sau găuri pentru a evita scurgeri contaminante periculoase. Sigure sunt gălețile din tablă de cupru, din tablă emailată sau din plastic rezistent la autoclavare (polipropilenă). Nu trebuie să fie mai adânci de 25 cm, pentru a permite o bună penetrare a vaporilor de apă, cu diametrul corespunzător unei manipulări facile în autoclavă. Niciodată nu se vor umple până la refuz.

Pungi din plastic autoclavabil este de dorit să dubleze interiorul găleților. Trebuie să fie rezistente și manipulate atent, pentru a evita spargerea sau ruperea. Legate la gură cu sârmă, vor fi transportate în camera de sortare împreună cu găleata suport. Gălețile și pungile colectoare vor fi marcate distinct pentru materialul reutilizabil și pentru cel disponibil.

Borcanele cu soluție dezinfectantă stau pe masa de lucru pentru colectarea echipamentului mic contaminat și, separat, a pipetelor contaminate. Prea frecvent sunt alese și manipulate incorect.

Alegerea borcanelor. Cele din sticlă sunt casabile și, ca atare, periculoase. De dorit sunt recipiente rezistente din polipropilenă. Pentru *echipamentul mic* convin borcane de 1 litru cu capac înșurubat (permite în final înclinări repetate, pentru imersarea completă a articolelor supuse dezinfecției). Borcanele înalte permit imersarea completă a *pipetelor* fără riscul scurgerilor contaminante.

Umplerea cu soluție dezinfectantă. Borcanele pentru echipamentul mic vor fi marcate cu vopsea la nivelul de 750 ml. Cu o măsură se introduce în borcan dezinfectant în cantitate suficientă să asigure concentrația recomandată pentru «circumstanța murdară» după completarea volumului la 750 ml cu diluent.

La fel se procedează și cu borcanele pentru pipete, ținând cont de volumul lor. Adăugarea unui detergent compatibil cu dezinfectantul utilizat (vezi tabelul 2.3) ușurează spălarea finală a pipetelor.

Utilizarea corectă a soluțiilor dezinfectante:

1. Borcanul nu se supraîncăcă, pentru a evita scurgeri contaminante la mobilizare.
2. Nu se introduc obiecte care plutesc, decât dacă pot fi umplute și imersate complet sau dacă borcanul are capac și poate fi înclinat repetat.
3. Nu se introduc materiale cu conținut proteic mare, ci se colectează separat pentru autoclavare directă.
4. Nu se diluează dezinfectantul prin scurgeri de lichide. Pentru supernatantul din tuburile de centrifugă se folosește un borcan separat cu soluție mai concentrată de dezinfectare și prevăzut cu până pentru reținerea aerosolilor contaminanți.
5. Nu se lasă mai mult de 24 ore materialele în soluția dezinfectantă și nu se refolosește soluția, pentru că se pot selecta și înmulți bacterii de contaminare rezistente.
6. Soluțiile dezinfectante nefolosite 24 ore se aruncă.

2.3.2. Tratarea materialelor pentru reutilizare sau dezafectare

Barierile antiinfecțioase prin care trece materialul contaminat din laborator în vederea reutilizării sau dezafectării sunt marcate în figura 2.5. Incinerarea este admisă numai sub supravegherea laboratorului. Dezinfecția cu șuntarea autoclavării este admisă numai pentru pipetele gradate.

Circuitul materialelor contaminate de la mesele de lucru până la dezafectare sau

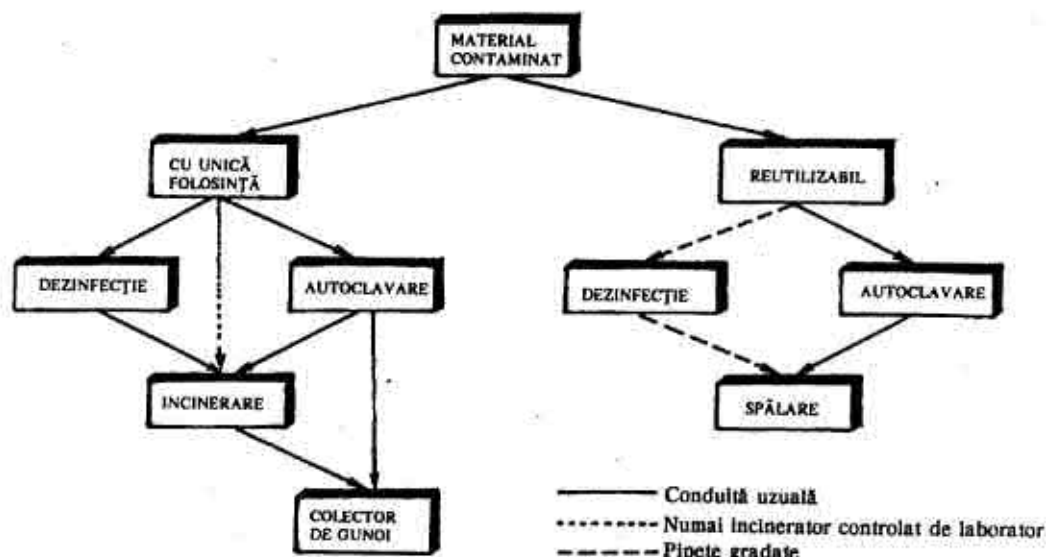


Fig 2.5. Barierele antinfecțioase prin care trece materialul contaminat din laborator (după C.H. Collins, 1989)

reutilizare (figura 2.6) este organizat și supravegheat de șeful laboratorului, pentru a preveni incrușișări cu materialele decontaminate sau sterile și ieșirea din laborator a unor materiale contaminate.

La intrarea în sectorul de pregătire a materialului (vezi figura 1.1) se rezervă o masă pentru recepția containerelor cu materiale contaminate.

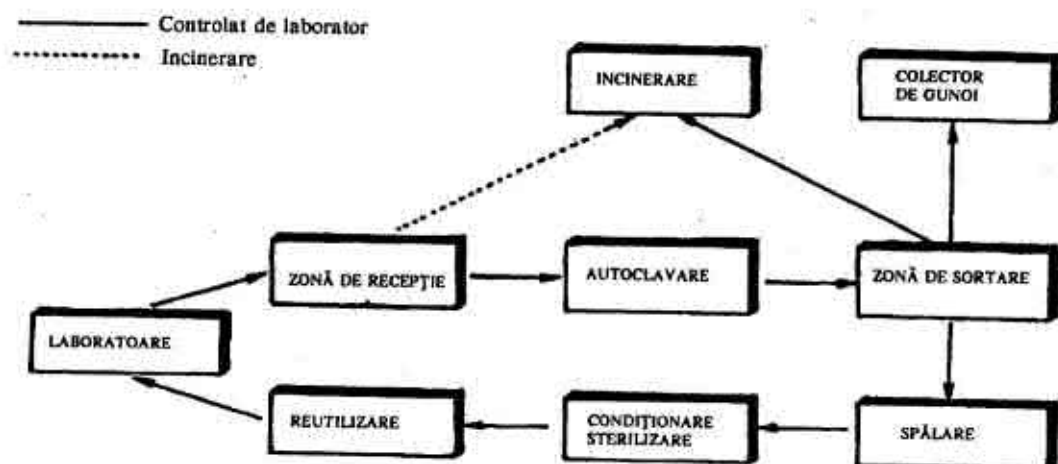


Fig. 2.6. Circuitul materialelor contaminate de la mesele de lucru până la dezafectare sau reutilizare (după C.H. Collins, 1989)

Autoclave separate sunt prevăzute pentru sterilizarea materialelor contaminate de aruncat și a materialelor reutilizabile. Gălețile se introduc în autoclavă fără capac, iar pungile dezlegate, deschise la gură și menținute în containerul lor. Disponerea containerelor în incinta de sterilizare trebuie să asigure acces liber vaporilor de apă.

Sticlăria contaminată. După autoclavare mediul de cultură este scurs sau raclat din recipiente. Urmează spălarea mecanică sau manuală cu apă caldă și detergent. Pentru spălarea manuală este necesar un set de perii adaptate fiecărui tip de recipient (eprubete, baloane etc.), o chiuvetă adâncă (bac) cu două compartimente: unul pentru spălare, altul pentru clătire, și lighene din plastic pentru clătirea finală cu apă distilată sau deionizată.

Garniturile din cauciuc pentru etanșarea capacelor înșurubate vor fi scoase, spălate separat într-o strecurătoare și reasamblate după uscarea ambelor piese.

Sticlăria calcosodică nouă poate elibera alcali în cursul autoclavării, ceea ce alterează pH-ul conținutului. Poate fi neutralizată prin imersare câteva ore în soluție 2—3% de acid clorhidric. Pentru verificare, un eșantion din fiecare lot va fi umplut cu apă neutră plus câteva picături dintr-un indicator adecvat; pH-ul trebuie să rămână neschimbat după autoclavare. *Sticlăria din borosilicat* nu impune aceste precauții.

Materialele colectate în soluție dezinfectantă. După ce au fost menținute peste noapte imersate în soluția dezinfectantă, sunt manipulate în continuare cu mâna protejată cu mănușă de cauciuc.

Pipetele gradate sunt scoase din soluția dezinfectantă, dopul de vată este aspirat printr-un tub de cauciuc cu capcană conectat la trompa de apă sau este șos cu un cârlig fin și sunt introduse în dispozitivul de spălare prin apă sub presiune sau prin sifonări repetate.

Echipamentul mic este reținut într-o strecurătoare din polipropilenă după scurgerea borcanului în chiuveta conectată la o fosăptică. În aceeași chiuvetă se scurg și borcanele din care au fost scoase pipetele. Strecurătoarea cu conținutul ei este apoi plasată într-un container pentru autoclavare.

Borcanele colectoare, golate de soluția dezinfectantă, sunt autoclavate pentru distrugerea contaminanților reziduali.

Incinerarea. Cât timp laboratoarele noastre nu dispun de incinerator special supravegheat de personal calificat corespunzător, este precaut a incinera numai materiale autoclavate, care nu sunt acceptate de serviciul de salubritate. Pentru a preveni poluări periculoase, este de dorit ca masele plastice să fie sub 20% din materialul incinerat.

2.4. CONSERVAREA

2.4.1. Conservarea prin agenți fizici

Pasteurizarea folosește acțiunea combinată a căldurii umede și frigului pentru conservarea lichidelor alimentare. În laboratorul de microbiologie nu are aplicații. Încălzirea lichidelor alimentare la temperaturi între 62° și 85°C (tabelul 2.5) distruge formele vegetative, dar nu omoară sporii și nici enterovirusurile. Refrigerarea imediată la 4°C completează, prin șoc termic, efectul microbiocid al căldurii și împiedică multiplicarea microorganismelor.

Tabelul 2.5. Tipuri de pasteurizare și aplicațiile lor

Tip de pasteurizare	Temperatură	Timp pentru		
		lapte	sucuri de fructe, vin	alte alimente
Înaltă	85°C	8—15 secunde	2 minute	—
Mijlocie	71—74°C	40—45 secunde		15 minute
Joasă	62—65°C	30 minute		30 minute

Refrigerarea la 4°C este larg folosită pentru conservarea alimentelor și a unor medicamente. La 4°C se conservă majoritatea prelevatelor patologice care nu pot fi examinate imediat și, pentru perioade de 3—6 luni, tulpinile de referință însămânțate în coloană de agar nutritiv moale.

Congelarea este o excelentă metodă de conservare a alimentelor. Efectele congelării asupra microbilor sunt minime când se realizează brusc la temperaturi inferioare punctului eutectic (—21,3°C), care evită formarea cristalelor de gheață și hiperconcentrarea salină, nocive pentru structurile celulare și starea coloidală a proteinelor. Congelarea în azot lichid (—196°C) conservă indefinit proprietățile biologice ale microbilor, iar congelarea între —70°C și —80°C (amestec de acool cu gheață carbonică) sau la —25°C (congelatoare de laborator) conservă câteva luni viabilitatea virusurilor și reactivitatea anticorpilor.

Desicarea este folosită în microbiologie pentru conservarea indefinită a tulpinilor unor bacterii sporulate și, pentru perioade limitate, a unor bacterii (langhete din hârtie de filtru impregnate cu suspensie microbiană și uscate). Numeroase alimente sunt conservate în stare desicată.

Liofilizarea este o excelentă metodă de conservare a microorganismelor, a serurilor imune și a unor reactivi biologici (e. g. alexina). În esență este o criodesicare: suspensia microbiană într-un mediu protector este congelată brusc în amestec de alcool cu gheață carbonică, uscată în vid și păstrată în fiole ermetic închise în atmosferă de gaz inert.

2.4.2. Conservarea chimică

Exemple de conservanți chimici cu utilizările lor apar în tabelul 2.6.

Tabelul 2.6. Domenii și modul de utilizare a unor prezervanți

Substanță	Domeniu de aplicare	Concentrație, %
Fenol	Seruri imune Vaccinuri	0,3—0,5
Mertiolat de sodiu	Seruri imune Preparate injectabile	0,004—0,02
Fenol + mertiolat	Seruri imune Colire	0,2 + 0,005 0,002 + 0,01
Benzoat de sodiu	Unguente Emulsii Alimente	0,2—1 0,2—1 0,1—1

2.5. ASEPSIA ÎN MICROBIOLOGIE

Asepsie înseamnă manipularea la adăpost de microorganisme.

Pentru o manipulare aseptică uzuală de material microbial se lucrează la adăpost de curenții de aer și se respectă următoarele exigențe (figura 2.7):

1. Se orânduiește pe masă echipamentul strict necesar.

2. Se așază comod pe scaun cu antebrațele complet pe blatul mesei și se fac toate mișcările sub controlul vederii.

3. Se ține ansa în mâna dreaptă, ca pe un creion, de extremitatea opusă firului.

4. Se ține în mâna stângă recipientul din care se prelevă sau în care urmează să se introducă materialul de manipulat, cât mai aproape de extremitatea inferioară, încât conținutul și traiectul ansei să rămână sub controlul vederii.

5. Se scoate dopul recipientului, cuprinzându-l între auricularul, inelarul și palma mâinii drepte. Se menține înclinat recipientul fără dop pentru a preveni depunerea de pulberi în interior. Similar, se evită expunerea orizontală a suprafeței plăcilor cu mediu agarizat.

6. Se sterilizează prin flambare gura recipientelor bușate cu vată.

7. Se introduce ansa în recipient pentru prelevarea sau depunerea materialului microbial. Se evită cu atenție atingerea cu ansa a gurii și pereților în zona superioară a recipientului.

8. Imediat după retragerea ansei, se flambează gura recipientului și se introduce dopul sau se înșurubează capacul.

9. Se resterilizează ansa.

Repartizarea aseptică a mediilor de cultură se face, ideal, în incinte sterile cu flux de aer laminar.

NOTĂ: Este interzisă utilizarea acestor incinte în scopul manipulării prelevatelor patologice și culturilor microbiene, deoarece fluxul de aer sterilizat este proiectat spre operator. În lipsa unei incinte sterile cu aer laminar, pentru repartizarea aseptică a mediilor de cultură se pot folosi incintele de siguranță microbiologică de clasa II.

Descrierea manipulărilor aseptice în condiții maxime de exigență (incintele pentru condiționarea medicamentelor injectabile etc.) depășește obiectivele acestui manual.

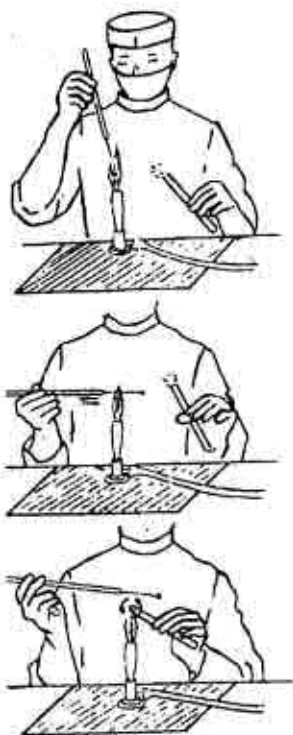


Fig 2.7. Etapele succesive ale unei manipulări aseptice de material microbial

METODELE MICROBIOLOGICE DE DIAGNOSTIC

3.1. RECOLTAREA, CONSERVAREA ȘI TRANSPORTUL MATERIALULUI EXAMINAT

Clinicianul cere depistarea unor microorganisme în prelevate patologice de la bolnav, pentru a stabili etiologia unei boli infecțioase și, prin aceasta, tratamentul antimicrobian corect. *Epidemiologul* urmărește prezența unui microorganism în prelevate patologice de la bolnavi, în probe recoltate de la persoane sănătoase și în probe de mediu (aer, apă, alimente etc.) pentru a stabili filiația cazurilor unei boli transmisibile, precum și căile de transmitere. *Igienistul* folosește microorganisme depistate în probe de mediu ca indicatori sanitari pentru calitatea ambianței noastre comunale, din școli, din spitale etc.

În acest capitol sunt prezentate metodele de recoltare, conservare și transportul prelevatelor patologice de la bolnavi sau purtători sănătoși. Aceleași probleme legate de prelevarea probelor de mediu le veți urmări în capitolele de Microbiologie sanitară.

3.1.1. Alegerea prelevatelor patologice

Microbul infectant, eventual antigeni ai săi, este căutat la poarta de intrare a infecției, în căile de răspândire în organism, în organele țintă și la nivelul căilor de eliminare, apreciate pe baza examenului și raționamentului clinic și în măsura în care acestea sunt accesibile prelevării prin tampon, prin puncție și aspirație, biopsie sau ca excreții. De exemplu la un pacient cu sindrom de febră enterică se vor preleva și examina: materiile fecale (intestinul — poartă de intrare, organ țintă și cale de eliminare a bacililor tifici), sângele (calea de răspândire a infecției în organism), măduva osoasă sau exsudatul maculelor cutanate (țesuturi țintă), urina (calea de eliminare). Pentru depistarea portajului de bacili tifici se examinează bila și urina.

Stadiul bolii influențează șansa izolării microbului. Continuând examenul de mai sus, șansele izolării bacilului tific în hemocultură scad de la 80—90% în prima săptămână de boală la numai 10% în săptămâna a 4-a; în schimb, în același interval, procentul izolărilor în coprocultură crește de la 10—15 la 75.

Prelevatele examinate trebuie să reprezinte realul produs patologic, adică material din leziuni care vehiculează microbul infectant sau antigenii săi. În sânge, în lichidul cefalorahidian sau în urină microbii antrenați din leziuni sunt repartizați uniform. Distribuția lor în probleme de spută, materii fecale, exsudate de pe suprafața mucoaselor, din plăgi ș.a. nu este în mod necesar uniformă. Dacă în loc de spută se trimite spre examinare salivă, în loc de exsudat amigdalian un tampon îmbibat cu salivă, un răspuns util din partea laboratorului este imposibil.

3.1.2. Norme de bază pentru prelevarea probelor destinate examenului microbiologic

1. Prelevările se fac *înaintea instituirii tratamentului antimicrobian*. Depistarea microbului infectant devine adesea imposibilă încă în primele ore de antibioticoterapie, chiar ineficientă.

2. Prelevatele patologice trebuie să fie în *cantitate suficientă* pentru efectuarea corectă a examenelor microbiologice.

3. Prelevările se fac *aseptic* cu instrumentar și în recipiente sterile. Trebuie:

- *Prevenită contaminarea probelor cu microbi din mediul extern.*

- *Prevenită sau redusă contaminarea probelor cu microbiota indigenă.* Orice contaminare a prelevatelor din zone normal sterile este critică (rezultate fals pozitive). Pentru prelevatele care traversează zone normal colonizate sau provin din asemenea zone ne limităm la reducerea cât mai eficientă a microbiotei de colonizare prin spălare. Când metoda nu dă rezultate, se poate recurge la prelevări care șuntează căile naturale de eliminare și contaminare (aspirația transtraheală, aspirația suprapubiană etc.). Acestea sunt însă tehnici agresive acceptate numai când relația risc — beneficiu înclină în favoarea beneficiului.

- *Prevenită infectarea pacientului în timpul prelevării, infectarea personalului și contaminarea mediului extern cu microbi patogeni.* Periculoasă este contaminarea suprafeței externe a recipientelor, spargerea lor. Sângele și alte umori sunt periculoase chiar când provin de la persoane aparent normale (pericolul virusului hepatitei B sau al imunodeficienței umane).

4. Prelevatele supuse analizei trebuie să fie însoțite de *date informative suficiente*. Acestea sunt cuprinse în cererea de analiză, parte componentă a buletinului de analiză, sau, în cazul anchetelor epidemiologice, în tabele nominale. Semnificația datelor informative se grupează astfel:

- date necesare identificării probei: numele, prenumele, vârsta pacientului, data recoltei, spitalul, secția, salonul;

- date necesare alegerii celor mai adecvate tehnici de prelucrare a probei: diagnosticul prezumtiv, natura probei, examenul solicitat (în termeni cât mai preciși), precizarea dacă este în cauză un bolnav (inclusiv data debutului bolii), convalescent sau purtător, precizări asupra terapiei antimicrobiene eventuale;

- date privind responsabilitatea recoltării și transportului: ora recoltării, data și ora primirii în laborator, medicul care a recomandat analiza și persoana care a făcut recoltarea și a asigurat transportul.

Importantă pentru evitarea unor erori este etichetarea probelor. Cea mai sigură este eticheta autoadezivă. În lipsă se poate recurge la eticheta din leucoplast. Pe etichete se notează cu creion negru sau pix cu bilă: numărul cererii de analiză, numele și prenumele pacientului, prelevatul și data.

3.1.3. Recipiente și instrumente

Pentru prelevări se folosesc, după caz, cutii Petri, eprubete, borcane de 200 ml din sticlă, prevăzute cu capac. Recipientele și instrumentarul destinate prelevării probelor pentru examenul microbiologic se sterilizează exclusiv prin agenți fizici după ce au fost foarte bine spălate pentru îndepărtarea oricăror urme de eventuale substanțe antimicrobiene.



Fig. 3.1. Tamponul de vată pentru prelevarea exsudatelor

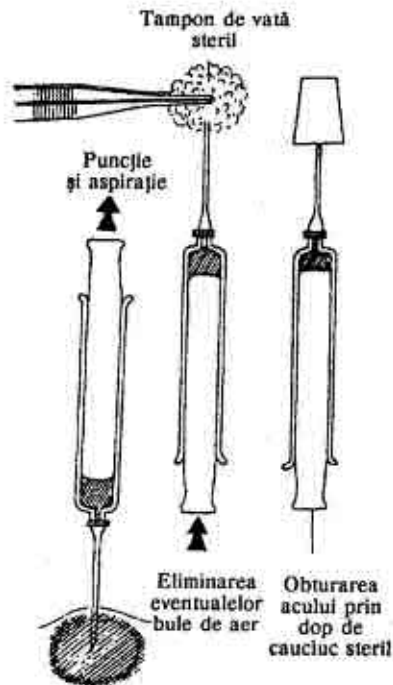


Fig. 3.2. Prelevarea și transportul în seringă a probelor de puroi destinate izolării bacteriilor anaerobe

Un instrument des utilizat pentru prelevare și transport de probe este tamponul de vată (figura 3.1), care trebuie să fie lipsit de inhibitori microbieni (ca acizi grași din vată, ioni metalici sau substanțe distilate din porttampon în cursul sterilizării). De aceea:

- se preferă porttamponul din lemn (nu de rășinoase, care conține substanțe nocive pentru unele microorganisme);

- tamponul se face din vată hidrofilă cu fibra lungă

Dopul trebuie să fie dens, pentru a preveni contaminarea sau desicarea probei. În vederea utilizării, tampoanele sunt sterilizate la autoclav ambalate câte 5—10 în hârtie.

Tamponul din vată este indicat pentru prelevarea și transportul exsudatelor de pe suprafața mucoaselor și a țesuturilor denudate. Are însă și dezavantaje, care trebuie cunoscute pentru o utilizare corectă:

- Se prelevă maximum 0,1 ml produs.

- Recuperarea bacteriilor de pe tampon este sub 10%; cel puțin 10^6 organisme trebuie prelevate pe tampon, pentru a le putea depista pe frotiul Gram extemporaneu. De aceea se va evita utilizarea tamponului ori de câte ori sunt posibile prelevări în cantități mai mari prin aspirația exsudatelor fluide, produse de chiuretaj sau biopsii. Se vor preleva mai multe tampoane, dacă examenul presupune efectuarea de frotiuri și însămânțări pe mai multe medii de cultură.

- Leucocitele polimorfonucleare se adsorb în scurt timp pe fibra de vată, alt motiv pentru efectuarea extemporanee a frotiului prin proba prelevată pe tampon.

- Prelevarea pe tampon este contraindicată pentru izolarea bacteriilor anaerobe.

Probele destinate izolării anaerobilor stricți sunt introduse sub atmosferă de azot în flacoane ermetic închise. În lipsa acestora, o modalitate simplă și eficientă este transportul direct în seringă de recoltare după ce a fost îndepărtată orice bulă de aer, iar acul obturat printr-un dop de cauciuc (figura 3.2).

3.1.4. Transportul și conservarea probelor

Moartea microbilor infectanți din probele destinate examenului microbiologic este o sursă de erori. Poate fi cauzată de: razele solare directe; deshidratare; modificări de pH; autoliză; oxigenul atmosferic în cazul anaerobilor stricți. De aceea, odată recoltate, probele trebuie examinate în cel mai scurt timp posibil sau conservate prin refrigerare și medii de transport adecvate.

Refrigerarea. La 0°C (container izoterm cu gheață umedă) sau la 4°C (frigider) majoritatea microbilor patogeni supraviețuiesc cele câteva ore necesare transportului, iar multiplicarea contaminanților este oprită. De exemplu, semivivața majorității virusurilor (intervalul în care infecțiozitatea suspensiei virale scade cu 50%) se măsoară în ore la temperatura camerei, în zile la 4°C și în luni la -70°C. Puține bacterii nu rezistă la refrigerare: meningococul, gonococul, *Haemophilus influenzae*.

Mediile de transport asigură supraviețuirea microorganismelor prevenind desicarea, variațiile de pH, oxidarea și autoliza. Un indicator, cum este roșu fenol, permite monitorizarea vizuală a pH-ului când această condiție este critică pentru supraviețuirea unor microbi (e.g. virusuri).

Microbii care sunt izolați pe culturi de celule sau embrioni de găină (ca virusurile și chlamidiile) se transportă în medii cu antibiotice (penicilină, streptomycină, nistatină). Când însă în același prelevat se urmăresc atât virusuri, cât și bacterii, proba se suspensionează în mediul de transport fără antibiotice, urmând ca acestea să fie adăugate diferențiat la prelucrarea probei în laborator.

3.1.5. Tehnici și prelevare (în ordine alfabetică)

1. Exsudatele bucale se prelevă de la pacienți cu stomatită ulceronecrotică Vincent, mângăritărel sau alte infecții ale gurii. După imobilizarea limbii cu apăsător steril, se șterge cu tamponul suprafața oricărei ulceratii, arii inflamate sau acoperită cu pseudomembrană. Dacă se solicită examen microscopic, tamponul se stoarce imediat pe o lamă de microscop și se etalează frotiul prin rularea tamponului. Frotiul fixat prin căldură (vezi 5.2.5.1) se expediază la laborator împreună cu al doilea tampon destinat cultivării.

2. Exsudatul cervical uterin se prelevă de la paciente cu leziuni la acest nivel sau pentru depistarea portajului de gonococ. Pacienta este plasată în poziție ginecologică. După examenul vulvei, speculul vaginal steril, umezit cu apă caldă (fără alt lubrifiant) este inserat blând pentru examenul colului uterin. Exocolul este șters de 2—3 ori succesiv cu comprese de tifon sterile pentru îndepărtarea secrețiilor stagnante, inclusiv cele de la nivelul orificiului. Dacă se observă leziuni, acestea sunt șterse cu tamponul de vată steril. Un tampon de vată steril este inserat în orificiul colului, rotit de câteva ori pentru a-l încălca cu exsudat și se reține cu precauția de a evita contaminarea cu conținut vaginal.

Pentru microscopie, frotiul se face extemporaneu cu un tampon separat.

3. Exsudatul conjunctival. Uzual este suficient un tampon cu care s-a șters exsudatul din unghiul intern al ochiului. Alte prelevări de la nivelul ochiului (raclat conjunctival, cornean) sunt exclusiv de competența specialistului oftalmolog.

4. Exsudatul faringian este prelevat pentru diagnosticul etiologic al anginelor și faringitelor sau pentru depistarea portajului de streptococi piogeni ori de bacili difterici. Prelevarea se face cu tamponul înainte sau la 3—4 ore după toaleta gurii ori ingestie de alimente. Pacientul așezat, cu gâtul în ușoară extensie, faringele bine expus prin iluminare

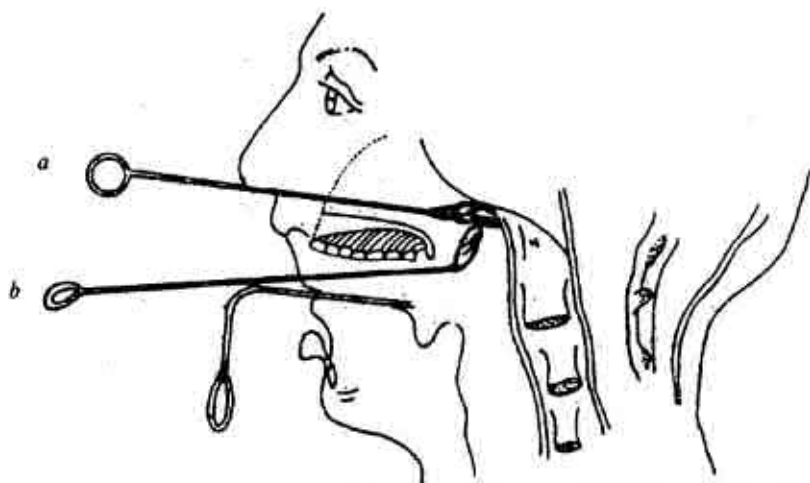


Fig.3.3. Prelevarea exsudatului nazofaringian pe cale nazală (a) și pe cale bucală (b)

și deprimarea bazei limbii cu apăsător steril, pronunță tare vocala A. Cu tamponul introdus în faringe, fără a atinge limba sau palatul, se șterge orice zonă inflamată, ulcerată sau cu depozite purulente. Când există, falsa membrană este ușor desprinsă și tamponată mucoasa subiacentă. Tamponul scos cu precauție se introduce în tubul protector. Pentru că prelevarea faringiană declanșează reflex de tuse, este indicat ca persoana care face prelevarea să se protejeze cu mască de tifon.

5. Exsudatul nazofaringian se prelevă pentru diagnosticul tusei convulsive, a unor pneumonii interstițiale și a portajului de microbi patogeni cum sunt meningococii, streptococii piogeni, bacilii difterici ș.a.

Mai ușoară este prelevarea nazală. Se utilizează tampon confecționat pe tijă din sârmă de crom-nichel cu lungime de 20 cm și grosime de 1 mm. Una din extremități este îndoită, înmuiată în colodiu și înfășurată strâns cu vată. Extremitatea liberă este îndoită în buclă pentru a facilita manipularea. Aceste tamponuri se pot obține din secția de O.R.L.

Capul pacientului este imobilizat și tamponul introdus blând în lungul planșeului nazal până atinge peretele posterior al nazofaringelui. Este lăsat câteva secunde pe loc, apoi rotit ușor, pentru a-l încărca cu exsudat, și retras. Cantitatea de prelevat crește când tamponul se retrage și se reinserează în aceeași poziție, prima tamponare stimulând secreția de mucus nazofaringian (figura 3.3).

Prelevarea pe cale bucală se face când abordarea nazală nu este posibilă. Se utilizează un tampon obișnuit cu tijă de sârmă. Extremitatea care poartă tamponul este îndoită în unghi drept în momentul scoaterii din tub. Tamponul, introdus prin gură în faringe, este trecut cu atenție în spatele palatului moale, pentru a șterge peretele posterior al nazofaringelui (figura 3.3). La introducerea și la scoatere se va evita contaminarea tamponului cu secreții faringiene și bucale.

6. Exsudate din plăgi și arsuri. Suprafața denudată, lipsită de țesut necrotic, se spală cu soluție salină izotonă sterilă pentru îndepărtarea exsudatului stagnant hipercontaminat. Tamponul, umezit cu soluție salină izotonă și stors pe peretele interior al recipientului, este rotit peste suprafața tisulară suficient de ferm, pentru a determina o ușoară sângerare din țesutul subiacent. Aceasta dă garanția prelevării microbului infectant din țesutul viabil. Tamponul imersat în 1 ml mediu de transport este imediat expediat la laborator pentru examinare.

7. Exsudatul vaginal. Pacienta este în poziție ginecologică. Se examinează vulva. Dacă pe labii sunt leziuni, exsudatul acestora se prelevă prin ștergere cu tamponul. Se inserează speculul vaginal (revedi punctul 2). Se examinează mucoasa vaginală. Dacă există leziuni, acestea se șterg cu tamponul steril. Când există numai congestie difuză, prelevarea se face din fundul de sac vaginal posterior. Se prelevă trei tampoane: unul este etalat prin rotire pe două lame de microscop curate, al doilea este descărcat imediat în cca 1 ml soluție salină izotonă sterilă, încălzită la 37°C, temperatură cu care trebuie să ajungă imediat la laborator, pentru examenul între lamă și lamelă, al treilea este destinat cultivării.

8. Fecalele se prelevă pentru depistarea agenților bolii diareice, a febrilor tifoidă și paratifoidă, a purtătorilor sănătoși ai patogenilor respectivi și pentru depistarea ouălor de viermi intestinali. Uzual se examinează probe de scaun emis spontan. Se pot folosi, la pacienți cu sindrom dizenteriform, și prelevări pe tampon rectal.

■ *Probe de scaun emis spontan*, metoda de elecție. Pacientul mai întâi micșionează, pentru a evita contaminarea probei cu urină. În spital defecă în bazinet sterilizat prin autoclavare sau dezinfectat prin fierbere. La domiciliu se folosește o oală de noapte dezinfectată prin opărire repetată cu apă clocotită. Imediat după defecare se prelevă cu o spatulă sterilă de lemn sau cu lingurița coproculturilor fragmente mucopurulente, flacoane riziforme, când acestea există, sau porțiuni din diferite puncte ale unui scaun omogen. Proba, cât un bob de mazăre, este suspensionată în mediul de transport din coprocult (figura 3.4). Mediul de transport nu este necesar pentru depistarea ouălor de viermi intestinali sau protozoarelor.

De la sugari se prelevă porțiuni din scaunul de pe pelincă.

■ *Probe de scaun provocat prin purgare* sunt indicate pentru depistarea portajului de enterobacterii patogene sau la pacienți cu diaree cronică. Pentru aceasta un adult ingerează 15 g sulfat de magneziu solvit în 250 ml apă. Doza la copii se adaptează în raport cu vârsta.

■ *Prelevarea pe tampon rectal*. Tamponul de vată steril, montat pe o tijă de lemn, se trece prin orificiul anal, se șterge cu grijă mucoasa rectală, se retrage și imediat este imersat în mediul de transport. Tijă este retezată și se adaptează capacul coproculturilor.

■ *Prelevarea direct din colonul sigmoid*. O sondă Nélaton, dezinfectată prin fierbere, este introdusă prin orificiul anal și rect, cca 15—20 cm la adult și 10—12 cm la copil, până în colonul sigmoid, al cărui conținut este aspirat cu o seringă de 10 ml, adaptată la capătul sondei. Proba este imediat descărcată și omogenizată în mediul de transport.

9. Hemocultura. *Material necesar*. Hemoculturile sunt cel mai frecvent urgențe medicale. De aceea în serviciile unde se internează pacienți cu septicemii sau cu condiții bacteriemice (pneumonii lobale acute, arsuri întinse infectate, avorturi septice, endocardite etc.) trebuie să existe, pregătite în permanență, truse pentru hemoculturi, care cuprind:

■ Soluții decontaminante pentru tegument: săpun lichid, alcool iodat 2%, eter.

■ Tamponi sterile din tifon de 5 × 5 cm, la nevoie pot fi înlocuite cu tamponi sterile din vată.

■ Bucată de mușama de 40 × 40 cm.

■ Seringă sterilă de 20 ml (corespunzător mai mică pentru copii), de preferat tip Luer din sticlă pentru a fi sterilizată gata montată. La nevoie pot fi folosite seringi de unică folosință cu volumul indicat.

■ Ac de rezervă.

■ Pensă pentru demontarea acului de puncție și montarea celui de rezervă.

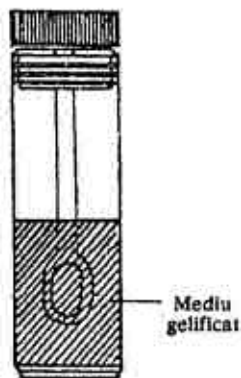


Fig. 3.4. Coproculturile

- Garou.
- Lampă de spirt.
- Flacoane cu bulion nutritiv preîncălzite la 37°C în termostatul din laboratorul secției.

Zone de puncție. Electiv: venele de la plica cotului. Alternativ: venele antebrațului inferior sau dorsale ale mâinii. La sugăr se puncționează vena jugulară.

Momentul prelevării. O singură hemocultură, chiar la un pacient cu septicemie, poate rămâne negativă. De aceea, la fiecare pacient cu indicație pentru hemocultură se efectuează trei hemoculturi. Când terapia antimicrobiană se impune urgent, aceste hemoculturi pot fi practicate la intervale de 30 minute—1 oră înainte de administrarea oricărui chimioterapic. Când terapia antimicrobiană nu este urgentă, hemoculturile se pot face și la intervale de 12—24 ore. Dacă pacienții au frisoane, este indicată efectuarea hemoculturii imediat ce pacientul semnalează apariția lor.

Procedura: Se lucrează la adăpost de curenți de aer. Cel care efectuează hemocultura trebuie să lucreze cu mâinile bine spălate, antiseptizate și uscate. Masca nu este obligatorie.

a) Pacientul în decubit dorsal. Sub braț în zona de puncție se așază bucata de mușama, pentru a preveni pătrunderea lenjeriei de pat cu soluții decontaminante.

b) Se aplică garoul la cca 10 cm proximal zonei de puncție și se strânge, pentru a putea aprecia prin palpate dimensiunea și elasticitatea venei de puncționat. Simpla inspecție vizuală frecvent nu depistează venele profunde excelente pentru puncție. La nevoie, venele sunt evidențiate mai bine dacă pacientul strânge și relaxează de câteva ori pumnul. Nu se masează și nu se fragelează brațul.

c) Se dă drumul la garou.

d) Se decontaminează larg, concentric, zona de puncție mai întâi prin spălare cu apă și săpun lichid, apoi prin badijonare cu alcool iodat de 2%. În final zona este badijonată cu eter, pentru a îndepărta iodul și a lăsa tegumentul perfect uscat. Puncția și aspirarea sângelui prin tegument umed expune proba contaminării cu bacteriile rezidente în porozitățile epidermei.

e) Se reaplică garoul.

f) Se fixează tegumentul deasupra punctului de puncție prin tensionare pe braț cu degetele mâinii libere.

g) Cu seringă poziționată în axul venei, pentru a forma un unghi de cca 30° cu tegumentul, acul fiind cu bizoul în sus, se puncționează pielea și vena subiacentă cu o mișcare moderat de bruscă. O cedare ușoară este uzual resimțită la pătrunderea acului în venă. Se pătrunde cu acul distanța estimată, pentru a plasa în venă bizoul cu o parte din lumenul acului.

h) Se exercită o ușoară presiune negativă prin retragerea pistonului. Sângele trebuie să pătrundă liber în seringă. Când scurgerea este neregulată, se rotește ușor seringă, pentru a repositiona bizoul în venă. Sângele nu se mai scurge în seringă, când vârful acului perforază vena și intră în țesuturi. Este suficient să se retragă puțin acul, pentru a obține sânge din nou.

i) Când sângele începe să se scurgă în seringă, se dă drumul la garou, pentru a preveni formarea unui hematom la locul puncției. La adult se extrag 15—20 ml sânge, iar la sugăr 1—3 ml.

j) Proba odată recoltată, se retrage acul din venă și imediat se presează punctul de puncție cu un tampon steril. Pacientul continuă compresia prin tampon, până ce hemostaza este completă. În final, peste zona puncției se aplică un tampon antiseptic autoadeziv.

k) Imediat se schimbă acul de puncție cu acul de rezervă și se însămânțează aseptice câte 5 ml sânge (cca 1/3 din volumul prelevat) în două flacoane cu 50 ml bulion nutritiv

și un tub de 25/250 mm cu 50 ml bulion special pentru izolarea bacteriilor anaerobe în prealabil fiert 20 minute în baie de apă și răcit brusc la curent de apă. Imediat după însămânțare, flacoanele și tubul sunt agitate cu atenție pentru omogenizarea conținutului.

Atenție! Înainte de a aprinde lampa cu spirt pentru însămânțarea aseptică a probei de sânge, flaconul cu eter trebuie pus în siguranță la distanță de patul bolnavului.

l) Toate flacoanele însămânțate se transportă la laborator pentru incubare imediată. NOTĂ. Contaminarea cu o singură bacterie din epidermă sau din ser compromise hemocultura (rezultat fals pozitiv).

10. Lichidul cefalorahidian. Prelevarea probei este de competența clinicianului infecționist și, dată fiind gravitatea contaminării meningelui, impune măsuri drastice de antisepsie și asepsie. Proba prelevată în 2 tuburi sterile (cca 2 ml/tub) este transportată imediat la laborator, fără refrigerare.

11. Părul. Pentru diagnosticul pilomicozelor, se prelevă cu pensa bonturile firelor de păr rupte și firele de păr cu aspect modificat (fără luciu, cenușii, prăfoase). De mare ajutor este examinarea părului la lampa Wood: în radiația ultravioletă firele de păr infectate au fluorescență verde strălucitoare sau gri-albă.

12. Puroiul din colecții se aspiră cu seringă prevăzută cu un ac gros și se expediază la laborator într-un tub steril. Când se suspectează o infecție cu bacterii anaerobe proba va fi expediată la laborator direct în seringă (revedi figura 3.2).

13. Spălătura gastrică se prelevă pentru depistarea bacililor tuberculozei la pacienți care nu expectorează (unii copii, femei). Pacientului, pe nemâncate, i se introduce o sondă Einhorn până în stomac. Prin sondă se injectează cca 10 ml soluție salină izotonă sterilă și se aspiră. Se neutralizează imediat prelevatul cu o soluție 10% bicarbonat de sodiu în prezența unui indicator de pH.

14. Sputa. Pacientul trebuie făcut să înțeleagă diferența dintre a «expectora» (eliminarea prin orofaringe a exsudatului mobilizat din căile respiratorii inferioare prin tuse profundă) și a «scuipa». Periajul simplu al dinților (fără pastă) și clătirea energică a gurii cu apă sunt de dorit înainte de prelevare. Se verifică dacă în probă există material mucopurulent (realul produs patologic). Dacă pacientul numai a scuipat, se insistă pentru prelevarea unei noi probe corespunzătoare. La pacienții cu tuberculoză sputa matinală este cea mai bogată în bacili.

15. Exsudate din șancru. Cu mâinile protejate în mănuși de cauciuc, se îndepărtează exsudatul stagnant de pe suprafața șancrului prin spălare cu soluție salină izotonă sterilă și un tampon din tifon. Se absoarbe cu tamponul de tifon excesul de lichid. În final se comprimă între degete baza șancrului până la apariția pe suprafața leziunii a unei picături de exsudat, care se prelevă cu pipeta Pasteur, prin capilaritate, pentru microscopia pe fond negru și frotiul Gram.

16. Tamponul nazal se prelevă pentru depistarea portajului de stafilococ auriu sau streptococi piogeni. Se șterge, pe rând, vestibulul foselor nazale cu un tampon umectat cu soluție salină izotonă sterilă.

17. Tegumentul. Din leziunile piodermitelor se prelevă puroiul sau exsudatul pe tampon. Pentru diagnosticul dermatofiziilor se raclează cu un bisturiu epiderma de la nivelul leziunilor. În alte infecții poate fi necesară prelevarea de cruste etc.

18. Urina.

A. Proba curată prinsă în zbor din jetul mijlociu de urină. Indicații: Pentru diagnosticul infecției căilor urinare determinată de *Escherichia coli* sau de alte bacterii condiționat patogene rezidente în colon ori uretra distală.

Principiu: Organismele condiționat patogene care infectează căile urinare se multiplică în urină în intervalul dintre micțiuni și realizează concentrații semnificativ mai mari (bacteriurie semnificativă) decât organismele aceluiași specii care contaminatează urina în

cursul micțiunii. Bacteriuria semnificativă este identificată corect dacă se reduce concentrația organismelor de contaminare prin spălarea suprafețelor de pe care provin (vulvă, pliul balanoprepușal, uretra distală).

Momentul prelevării: prima urină matinală sau după cel puțin 3 ore de la micțiunea anterioară.

Volumul necesar: aproximativ 10 ml.

Prelevarea la femei. Necesari: cameră pentru recoltare prevăzută cu masă ginecologică, bideu, chiuvetă cu apă curentă și săpun, boiler, hârtie igienică, irigator, recipient cu săpun lichid, seturi de tamponare din tifon, recipient cu pungă pentru colectarea tamponurilor utilizate, recipiente pentru colectarea urinei.

Instrucțiunile de mai jos trebuie afișate pe perețele camerei pentru recoltă, repetate verbal și controlată respectarea. Sora asistă pacienta pentru etapele mai dificile ale prelevării.

- a) Se scoate lenjeria intimă.
- b) Măinile se spală cu apă și săpun și se usucă cu hârtie igienică.
- c) Se încăleacă bideul cu fața spre spatele acestuia.
- d) Cu o mână, pacienta își îndepărtează labiile mici și le menține ca atare pe toată durata procedurii.
- e) Cu cealaltă mână șterge ferm vulva, în sens unic, din față spre spate, de 3 ori cu câte un tampon steril de tifon înmuiat în săpun lichid.
- f) Cu ajutorul irigatorului, regiunea decontaminată este clătită abundant cu apă caldă sterilă (apă de robinet fiartă și răcită) pentru a îndepărta urmele de săpun.
- g) Se usucă zona vulvară decontaminată cu 2 tamponuri de tifon sterile cu utilizare unică procedând din față spre spate. Dacă se omite uscarea, prin pelicula de lichid microorganisme din zonele nedecontaminate pot fi antrenate spre jetul de urină.
- h) Pacienta urinează cca 100 ml în timp ce degetele mențin în continuare labiile depărtate.
- i) Fără a întrerupe jetul de urină, se prinde în borcan volumul necesar de urină (jetul mijlociu), cu precauții pentru a nu atinge gura borcanului de tegument sau lenjerie.
- j) Se retrage borcanul din jet cât timp labiile sunt încă depărtate și micțiunea continuă. Întreruperea jetului în cursul procedurii (înainte sau imediat după prinderea probei în borcan) poate contamina proba prin picăturile de urină care se preling peste zonele nedecontaminate ale vulvei.

La pacientele cu scurgeri vaginale trebuie să intervină sora, care pregătește în aceeași manieră regiunea vulvară, iar în final introduce în vagin un tampon steril de vată. Procedura impune utilizarea mesei ginecologice. O probă de 10 ml cu urină normală contaminată cu numai 0,1 ml scurgere vaginală dă în urocultura cantitativă un rezultat fals pozitiv.

Prelevarea la bărbați. Necesari: a se vedea prelevarea la femei. În locul bideului este indicat un urinoar, irigatorul poate fi înlocuit cu o simplă cană, iar masa ginecologică nu este necesară.

- a) Se spală mâinile (vezi prelevarea la femei).
- b) Se retractă prepușul, pentru a decalota complet glandul.
- c) Se șterge glandul ferm, în sens unic, dinspre meatul uretral spre șanțul balanoprepușal peste fren, de 3 ori cu câte un tampon steril de tifon înmuiat în săpun lichid.
- d) Se clătește glandul abundant cu apă caldă sterilă pentru a îndepărta urmele de săpun.
- e) Se usucă glandul (vezi procedura la femei).
- f) Pacientul, menținând în continuare glandul decalotat, urinează cca 100 ml.

g) Fără a intrerupe jetul, se prinde în borcanul steril cca 10 ml urină, după care se retrage borcanul în timp ce micțiunea continuă.

Prelevarea de la copilul necooperant (nou-născut, sugar) este dificilă. Se decontaminează și se usucă organele genitale externe și perineul. În jurul penisului sau vulvei se fixează orificiul unei pungi sterile din material plastic. În lipsa acestui dispozitiv trebuie păndit momentul micțiunii, pentru a prinde proba într-un flacon cu gura largă.

B. *Proba prinsă în zbor din jetul mijlociu de urină fără decontaminarea specială a organelor genitale. Indicații:*

- depistarea în urină a unor patogeni care nu sunt rezidenți ai colonului sau uretrei distale (bacilii tuberculozei, bacili tifici, leptospire);

- supravegherea epidemiologică a infecției căilor urinare cu organisme condiționat patogene (consult prenatal al gravidelor, al colectivităților școlare, de femei etc.).

Principiu: simpla prezență în urină a organismelor patogene nerezidente ale uretrei are semnificație clinică. Bacteriuria semnificativă cu organisme condiționat patogene depistată în asemenea probe trebuie confirmată prin reexaminarea unei probe curate (vezi mai sus).

Volumul necesar: cca 50 ml pentru depistarea microorganismelor patogene; cca 10 ml pentru depistarea celor condiționat patogene.

Procedura se poate efectua într-un simplu cabinet de toaletă cu facilități minime pentru prinderea jetului mijlociu: chiuvetă cu apă și săpun, hârtie igienică, bideu, urinoar.

Transportul la laborator al probelor de urină se face imediat, pentru ca examenul bacteriologic să înceapă maximum la o oră după prelevare. Dacă aceasta nu este posibil, probele trebuie refrigerate la 4°C imediat după prelevare. Bacteriile de contaminare se pot multiplica la temperatura camerei în probele de urină determinând bacteriurii fals pozitive.

Practici greșite: recoltarea urinei în vas mare (borcan, oală de noapte etc.) și transvazarea probei în eprubetă pentru expedierea la laborator; recoltarea probelor la domiciliu.

3.2. TEHNICI PENTRU DEPISTAREA ȘI IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR

Microorganismele pot fi depistate prin:

- Microscopie.

- Cultivare pe medii de cultură artificiale.

- Izolare pe gazde vii (animale de experiență, embrioni de găină, culturi de celule).

- Tehnici imunologice de identificare a antigenilor microbieni.

- Tehnici de biologie moleculară pentru identificarea fragmentelor de ADN microbial (sau și ARN viral) prin sonde de acizi nucleici marcate sau reacția de amplificare genică (*Polymerase Chain Reaction*, abreviat PCR) (a se vedea cursul de genetică microbială).

Algoritmul investigației microbiologice este schematizat în figura 3.5.

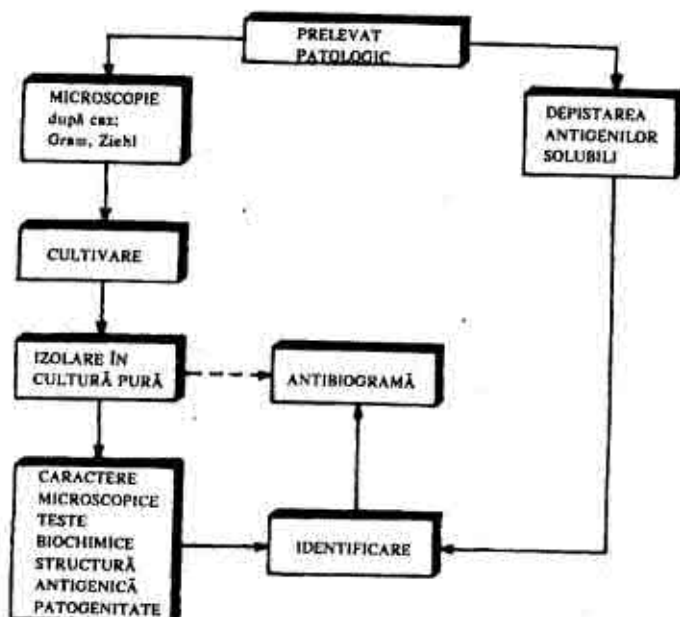


Fig. 3.5. Algoritmul investigației microbiologice

3.2.1. Examenul macroscopic

Examenul macroscopic:

1. Previne prelevarea și examinarea unor probe necorespunzătoare (e.g. salivă în loc de spută).
2. Reperează realul produs patologic sub forma porțiunilor fibrinopurulente în expectorații, mucosangvinolente în fecale, a granulelor de sulf în puroi.
3. Poate influența decizia clinică imediată (e.g. un lichid cefalorahidian purulent indică o meningită cu bacterii piogene, care impune tratament antimicrobian urgent).

3.2.2. Microscopia

Microscopia optică, metodă uzuală, permite rapid (30—60 minute):

1. Depistarea și identificarea rapidă a *protozoelor*.
2. Depistarea și identificarea preliminară a *bacteriilor* și *fungilor*. Bacterioscopia depistează de la 10^{4-5} bacterii/ml în sus. Prezența în medie a 1—2 bacterii/câmp microscopic examinat cu mărire de 1000X corespunde la circa 10^5 bacterii/ml probă, iar a peste 10 bacterii/câmp la mai mult de 10^6 bacterii/ml probă.
3. Studiul *micoplasmelor* izolate în culturi.
4. Depistarea și identificarea preliminară a incluziunilor *chlamidiale* sau *virale*.
5. Obiectivarea calității unor prelevate (e.g. sputa) prin observarea raportului dintre

celulele inflamatorii (aduse de către realul produs patologic, care vehiculează microorganismele căutate) și celulele epiteliale scuamoase (aduse de secrețiile contaminante).

6. Alegerea anumitor medii de cultură și metode de izolare.

Tehnica microscopiei este detaliată în capitolul 4.

3.2.3. Izolarea

Izolarea microorganismelor în culturi pure este o metodă de investigație:

- mult mai sensibilă decât microscopia, dar necesită intervale mai mari de timp;
- indispensabilă identificării corecte a microorganismelor investigate.

Izolarea *protozoarelor* este rar necesară. Aceste organisme sunt suficient de mari și au suficiente caractere morfologice pentru a putea fi depistate și identificate prin microscopia directă a probelor.

Cele mai multe *bacterii* și *fungi* sunt organisme care pot fi și trebuie izolate pe medii de cultură artificiale. Unele cresc rapid (1—7 zile), altele cresc lent (4—8 săptămâni). Multe bacterii au exigențe nutritive deosebite și necesită medii de cultură îmbogățite. Unora nici nu le putem satisface aceste exigențe și nu le putem izola pe medii artificiale, ci numai pe gazde vii.

Virusurile, *rickettsiile* și *chlamidiile* sunt izolate prin inoculare în culturi de celule, în oul embrionat sau la animale de laborator receptive.

Amănunte tehnice privitoare la izolarea și studiul microorganismelor cultivate pe medii artificiale pot fi urmărite în capitolul 5, iar izolarea și studiul microorganismelor prin inoculări la animale de experiență sunt prezentate în capitolul 9.

3.2.4. Identificarea

Foarte pe scurt, identificarea unui microorganism impune:

- izolarea sa în cultură pură;
- studiul caracterelor microscopice;
- studiul etapizat al caracterelor sale fiziologice (caractere de cultură, activități biochimice);
- compararea acestor caractere cu cele ale unităților deja constituite și numite.

3.2.4.1. Cultura pură

Microbiologul nu poate manipula microorganismele ca indivizi, ci ca mulțimi de indivizi numite populații. *Populația* este o mulțime de indivizi care aparțin aceleiași specii (unitatea de bază în clasificarea lumii vii) și habitează același mediu.

Cultura pură este constituită din indivizi foarte asemănători unii cu alții. Ideal, cultura pură este o *clonă*, adică o populație constituită din descendenții unui singur individ prin înmulțire vegetativă.

Tulpina este o populație microbială constituită din descendenții unei singure izolări în cultură pură, pe care o manipulăm pentru studiu. Până la momentul identificării, tulpinile microbiene noi le numim simplu «izolate» și le individualizăm numai printr-un număr (numărul de înregistrare al prelevatului din care au fost izolate), eventual urmat de inițialele pacientului de la care provine proba (e. g. tulpina 273 M.I.).

3.2.4.2. Studiul și numirea izolatelor

Studiul caracterelor constante ale izolatelor se efectuează în etape succesive:

- *Studiul caracterelor microscopice*: forma, așezarea, reacțiile de culoare, particularități structurale (pentru amănunte a se vedea capitolul 4).

- *Studiul caracterelor de cultură*: exigențele nutritive și de incubare a culturii, intervalul necesar apariției culturii, aspectul coloniilor (pentru amănunte a se vedea capitolul 5).

- *Studiul spectrului activității biochimice*.

Asemenea caractere constante utile pentru identificare sunt numite *caractere cheie* și se compară cu caracterele speciilor tip înscrise în determinatoare. Pentru o comparație facilă, microbiologul are la dispoziție chei dihotomice de identificare. Asemenea chei sunt instrumente de analiză antitetică: pun întrebări la care se răspunde prin DA sau NU (tabelul 3.1). Caracterele cheie pozitive devin caractere de diagnostic.

Tabelul 3.1. Exemplu de utilizare a cheii dihotomice la identificarea unei bacterii gramnegative

Caracterele cheie	Genuri mai importante cu interes medical
1. Parazit obligat intracelular	<i>Rickettsia, Rochalimaea, Coxiella</i>
2. Diferit de 1	<i>Spirillum, Campylobacter</i>
a. Spirili	
a.a. Diferit de a.	
b. Bacili	
c. Aerobi	<i>Pseudomonas</i>
c.c. Facultativ anaerobi	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Shigella</i> etc.
	<i>Vibrio</i>
	<i>Haemophilus</i>
	<i>Pasteurella</i>
c.c.c. Anaerobi	<i>Bacteroides, Fusobacterium</i>
b.b. Coci sau cocobacili	<i>Neisseria, Moraxella, Brucella, Bordetella,</i>
c. Aerobi	<i>Francisella</i>
c.c. Anaerobi	<i>Veillonella</i>

Progresiv, izolatele sunt încadrate în unitățile taxonomice cu care au cele mai multe caractere în comun și capătă denumirea acestor unități: de familie, apoi de gen și în final de specie. De exemplu izolatul 273 M.I. este o *Enterobacteriaceae* (familia), din genul *Escherichia*, specia *Escherichia coli*. Este deci tulpina 273 M.I. de *Escherichia coli*.

3.2.4.3. *Markeri de tulpină infraspecifici*

Clinicianul este interesat să cunoască anumite caractere ale tulpinilor infectante cum sunt *patogenitatea* (e. g. toxigeneza, capacitatea enteroinvazivă) sau *antibiograma* (spectrul de sensibilitate la antibiotice).

Epidemiologul trebuie să cunoască o serie de caractere infraspecifice ale tulpinilor prin care poate stabili filiația cazurilor unei boli transmisibile. Asemenea caractere infraspecifice sunt numite *markeri epidemiologici*. Dintre markerii epidemiologici frecvent utilizați a se reține:

- *serovarul* (o anumită structură antigenică a tulpinii, identificată prin reacții antigen-anticorp cu seruri imune de referință, vezi capitolele 10 și 13);
- *lizovarul* (un anumit spectru de sensibilitate la bacteriofagi, vezi capitolul 8);
- *biovarul* (activități biochimice particulare).

MORFOLOGIA ȘI ULTRASTRUCTURA BACTERIILOR. METODA MICROSCOPICĂ DE EXAMINARE

Examenul microscopic permite depistarea rapidă a microbilor, observarea morfologiei, reacțiilor de culoare și a unor detalii structurale necesare identificării lor. De aceea microscopul optic este indispensabil oricărui laborator de microbiologie, iar microbiologul trebuie să cunoască tehnicile de microscopie.

4.1. MICROSCOPUL OPTIC, RECAPITULĂRI INDISPENSABILE

4.1.1. Definiție și principiul de funcționare

Microscopul este format, în esență, din două sisteme de lentile cuplate:

- obiectivul, sistem de lentile cu distanța focală de ordinul mm, situat către obiectul examinat;
- ocularul, sistem de lentile cu distanța focală de ordinul cm, situat către ochiul examinatorului.

Obiectivul formează imaginea primară, reală mărită și răsturnată a obiectului plasat imediat dincolo de distanța focală. Ocularul funcționează ca o lupă: reia imaginea primară, formată imediat înăuntrul distanței sale focale, și o transformă în imagine virtuală, mult mărită, răsturnată și obținută la distanța minimă a vederii clare a observatorului (20—25 cm), care corespunde aproximativ nivelului mesei portobiect a microscopului (figura 4.1).

4.1.2. Descrierea microscopului optic

Orice microscop are în componență o parte mecanică, un sistem optic și un sistem de iluminare (figura 4.1). Detalii privind forma și amplasarea diferitelor componente ale acestor sisteme pot varia în raport cu firma producătoare.

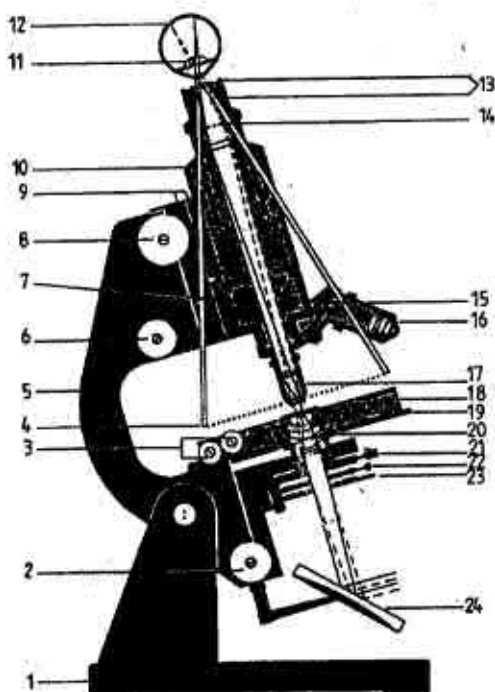


Fig. 4.1. Schema microscopului optic: 1 — picior; 2 — buton de focusare a condensului; 3 — butoane pentru mișcarea mesei portobiect; 4 — imaginea finală, virtuală și mărită, dată de ocular; 5 — braț; 6 — butonul mișcării fine; 7 — reperi pentru cursa mișcării fine; 8 — butonul mișcării grosiere; 9 — corp; 10 — tub; 11 — lentilele ochiului; 12 — retină; 13 — oculare; 14 — imaginea primară, reală, mărită și răsturnată, dată de obiectiv; 15 — capul revolver; 16 — obiectiv cu mărire puternică; 17 — obiectiv cu mărire slabă; 18 — masă portobiect; 19 — obiect; 20 — condensor; 21 — buton de centrare a condensului; 22 — diafragma iris de apertură a condensului; 23 — suport inelar pentru filtre; 24 — oglindă (după R. Cruickshank, 1975)

4.1.2.1. Partea mecanică

Piciorul 1 suportă și asigură stabilitatea aparatului. Pe picior se articulează brațul microscopului 5 care poartă corpul cu tubul microscopului 9, 10 și masa portobiect 18.

Mișcarea tubului în axul optic al microscopului este asigurată prin deplasarea corpului cu ajutorul dispozitivelor de focalizare grosieră și fină acționate prin butoanele 8 și, respectiv, 6. Domeniul de lucru al mișcării fine este limitat la cca 1,7 mm și este indicat prin două reperi gravate pe corpul microscopului și un indicator pe culisa mișcării fine 7. Pentru a păstra capacitatea de deplasare a tubului în cele două sensuri, indicatorul trebuie adus la mijlocul cursei, marcată de cele două reperi.

Condensorul 20 este focalizat printr-un buton 21.

Masa portobiect 18 este prevăzută cu deschidere centrală pentru lumnarea obiectului, suportți reglabili pentru fixarea lamei portobiect și butoane care controlează mișcările mesei pe direcție transversală și longitudinală 3.

4.1.2.2. Sistemul optic

Sistemul optic este purtat de tubul microscopului. Obiectivele 16, 17 se adaptează la partea inferioară a tubului prin capul revolver 15, care, prin rotire, le aduce după dorință în axul optic. Un pinten acționat cu un resort face să se perceapă un declic la poziționarea corectă a fiecărui obiectiv în axul microscopului. Ocularele 13 se adaptează prin telescoperare la partea superioară a tubului. Microscopurile moderne sunt prevăzute cu cap binocular, care adaptează ocularele la distanța interpupilară a observatorului și permit corecții pentru ametropiile interoculare.

Puterea de mărire a microscopului se calculează multiplicând puterea de mărire a obiectivului cu puterea de mărire a ocularului folosite la examinare și, la microscopurile binoculare, cu cea a capului binocular (valori gravate pe montura fiecăreia din aceste piese). Puterea de mărire se exprimă printr-un număr care arată de câte ori diametrul imaginii este mai mare decât diametrul obiectului real.

Puterea de mărire a obiectivului este invers proporțională cu distanța focală a acesteia, pentru că:

$$\text{puterea de mărire a obiectivului} = \frac{\text{lungimea mecanică a tubului}}{\text{distanța focală a obiectivului}}$$

De aici derivă o altă mărime cu importanță practică: *distanța de lucru a obiectivului*, exprimată prin distanța dintre lentila obiectivului focalizat pe un preparat subțire și suprafața lamei de acoperire a preparatului. Distanța de lucru scade cu puterea de mărire a obiectivului (figura 4.2).

Grosimea și aria preparatului observate la un moment dat scad o dată cu distanța focală a obiectivului. De aceea pentru examenul de ansamblu al unui preparat sunt indicate obiective cu putere de mărire mică (profundime focală mare), iar pentru examenul detaliilor, obiective puternice (profundime focală mică).

Mărirea utilă este mărirea care oferă o imagine cu detalii a obiectivului real. Când depășește o anumită limită, mărirea nu mai oferă aceste detalii și devine *mărire goală*, inutilizabilă (un simplu contur lipsit de detalii). Mărirea utilă a microscopului depinde de *puterea de rezoluție a obiectivului*. Ecuația care definește puterea de rezoluție a obiectivului este:

$$d = \frac{\lambda}{2AN}$$

unde:

d — cea mai mică distanță între două puncte luminoase ale preparatului pentru care obiectivul mai formează în ochiul observatorului imagini distincte (puterea de rezoluție);

λ — lungimea de undă a luminii utilizate (domeniul vizibil de 400—750 nm);

AN — apertura numerică a obiectivului.

Apertura numerică a obiectivului exprimă cantitatea de lumină utilizată de aceasta pentru formarea imaginii. Ea rezultă din ecuația:

$$AN = n \cdot \sin \alpha,$$

unde:

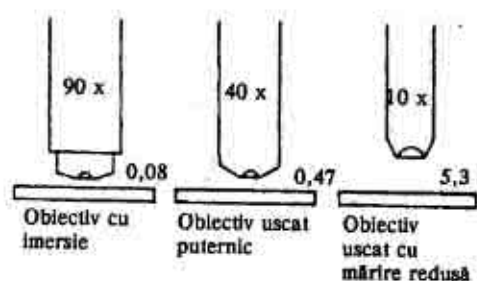


Fig. 4.2. Relația dintre puterea de mărire, distanța focală și de lucru a obiectivelor

n — indicele de refracție al mediului interpus între obiect și lentila frontală a obiectivului;

α — semiunghiul de deschidere al lentilei frontale a obiectivului, unghi cu vârful în focar (figura 4.3).

Obiectivele uscate, obiectivele la care mediul interpus între obiect și lentila frontală a obiectivului este aerul, au apertură numerică teoretică maximă 1,0: indicele de refracție al aerului $n = 1$ și $\sin 90^\circ = 1$ (valoarea maximă a unghiului α când lentila frontală a obiectivului este aplicată pe obiect). Apertură numerică maximă practică a obiectivelor uscate este însă 0,95.

Obiectivele cu imersie sunt obiective la care mediul interpus între obiect și lentila frontală are un indice de refracție mai mare decât al aerului și apropiat de cel al sticlei, de exemplu uleiul de cedru are $n = 1,515$, egal cu al sticlei crown. Apertură numerică maximă practică a obiectivelor cu imersie este de 1,4 (realizată la obiectivele apocromate). Obiectivele cu imersie utilizate curent au apertură numerică de 1,25 sau 1,30.

Conform ecuației de mai sus, puterea de rezoluție a microscopului optic la o apertură numerică dată poate crește prin scăderea lungimii de undă a luminii folosite pentru examinare.

Capacitatea obiectivului de a forma imagini precis conturate se numește *capacitate definitorie* și se asigură prin corecția aberațiilor sferică și cromatică ale lentilelor. Această corecție se face asociind o lentilă convexă cu una concavă cu curburi egale, deci cu aberații egale, dar de semn contrar. Pentru a păstra convergența sistemului, lentila convexă se confecționează dintr-o sticlă cu indice de refracție superior (sticlă crown) celui al lentilei concave (sticlă flint).

Obiectivele acromate au corectată aberația cromatică prin suprapunerea focarului a două radiații. Se utilizează în microscopia curentă.

Obiectivele apocromate au corectată aberația cromatică prin suprapunerea focarului a trei radiații și totodată au apertură numerică maximă. Sunt scumpe.

Fiecare obiectiv are gravate pe montură indicațiile care ne permit alegerea lor pentru lucru: puterea de mărire, apertura numerică, corecția aberațiilor, lungimea mecanică a tubului și grosimea lamei de acoperire pentru care a fost corectat (figura 4.4). Microscopia curentă în laboratorul de microbiologie clinică utilizează următoarele obiective acromate: 10X/0,30/-, 40X/0,65/0,17 și 90X/1,30/0,17, la care se asociază, după necesitățile de mărire, ocularele 5X, 7X sau 10X.

4.1.2.3. Sistemul de iluminare

Sursa de lumină. Pentru iluminarea preparatului se poate folosi lumina din sursă exterioară dirijată către preparat prin deschiderea mesei portobiect cu ajutorul unei oglinzi 24. La microscopul modern sursa de lumină și dispozitivele de dirijare a fascicolului luminos (diafragma de câmp, oglinda și butoanele pentru reglarea oglinzii) sunt incluse în piciorul microscopului.

Condensorul de câmp luminos 20 este un sistem de lentile care focalizează lumina

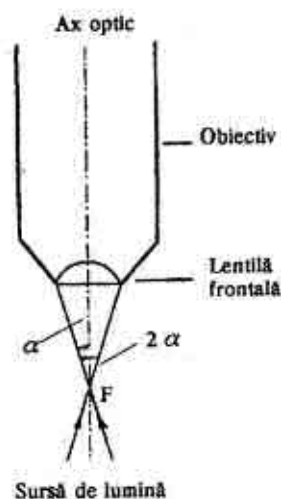


Fig. 4.3. Reprezentare schematică a unghiului de apertură



Fig. 4.4. Parametrii gravați pe montura obiectivelor

principiul și detaliile tehnice necesare (vezi 4.3).

4.2. MICROSCOPIA OPTICĂ PE CÂMP LUMINOS, METODA UZUALĂ

Bacteriile, funghi, protozoarele se urmăresc în produse patologice sau în culturi fi în stare nativă, vie (preparate umede), fie după fixare și colorare (preparate colorate).

4.2.1. Pregătirea microscopului

Pentru microscopia curentă în microbiologie se recomandă lumina artificială asigurată printr-un bec mat de 40—60 W sau o lampă de mare intensitate prevăzută cu diafragmă iris. Lumina difuză a zilei, variabilă ca intensitate, frecvent este insuficientă, iar lumina solară directă pătrunde în ochi și jenează observarea detaliilor microscopice. De aceea microscopul va fi plasat pe o masă într-o latură a încăperii, care să permită așezarea examenatorului cu spatele la fereastră.

1. Se așază preparatul microscopic pe masa portobiect.
2. Folosind fața plană a oglinzii, se reflectă lumina în condensor. Fața concavă se folosește numai la examenul cu obiectivul 6X/0,10/- și condensorul scos.
3. Se focalizează preparatul cu obiectivul 10X, manipulând butonul mișcării grosiere.
- 4a. Se corectează poziția oglinzii, pentru a obține intensitatea luminoasă maximă.
- 4b. Dacă se utilizează lampă de mare intensitate prevăzută cu diafragmă iris, se închide diafragma la 1/2 și se manipulează oglinda pentru a face această diafragmă, care e numită diafragmă de câmp, concentrică cu câmpul microscopic. Se manipulează apoi în sus și în jos condensorul, pentru a focaliza net imaginea diafragmei de câmp, care acum poate fi deschisă până aproape de limita câmpului. Deschiderea diafragmei peste limita câmpului introduce lumină parazită în obiectiv și dă imaginii strălucire supărătoare.
5. Se scoate ocularul, se privește prin tub și se închide diafragma de apertură până la 1/2—2/3 din diametrul pupilei de ieșire a obiectivului. Din această poziție, deschiderea diafragmei de apertură spre limita maximă mărește puterea de rezoluție și reduce contrastul imaginii, dar închiderea ei către limita inferioară reduce puterea de rezoluție și majorează contrastul imaginii.

Reglarea diaframelor se face pentru fiecare obiectiv utilizat.

asupra preparatului, contribuind esențial la luminozitatea imaginii. Un bun condensor este acromat și adaptabil la apertura numerică a obiectivului. Pentru aceasta din urmă condensorul dispune de o diafragmă iris, diafragma de apertură 22 manipulată cu o pârghie. Dacă apertura numerică a condensorului o depășește pe cea a obiectivului, excesul de lumină produce strălucirea supărătoare a imaginii, iar dacă este redusă mult sub cea a obiectivului, se pierd detaliile ale imaginii. Condensorul culisează pe verticală acționat de un buton 2.

Condensoarele pentru alte metode de iluminare, pe fond negru, în contrast de fază sau fluorescează, sunt prezentate mai jos cu indicațiile,

6. Dacă după reglarea diafragmelor lumina este prea puternică, nu se mai acționează diafragmele, nici condensorul, ci se introduce un *filtru* în calea fluxului luminos: filtrul albastru, care asigură nuanța albă a luminii, sau filtrul fumuriu. Filtrul verde mărește puterea de rezoluție a microscopului și contrastul imaginii, dar denaturează culorile preparatului.

Se alege, prin scrutare cu obiectiv slab, regiunea preparatului care trebuie examinată în detalii, se va folosi pentru aceasta un obiectiv uscat puternic (40X) sau obiectivul cu imersie (uzual 90X). În continuare se descrie modul de lucru pentru obiectivul cu imersie.

7. Se pune o picătură de ulei de cedru pe regiunea de examinat a preparatului aflată sub obiectiv. Se evită atingerea froțiurilor cu bagheta pentru ulei, care poate fi contaminată astfel cu bacterii de pe froțiuri, sursă de erori la examenele ulterioare.

8. Se rotește revolverul și se aduce în axul microscopului obiectivul cu imersie, ridicând condensorul până în planul mesei portobiect (aceasta nu este necesar, dacă se utilizează o lampă de mare intensitate cu diafragmă și se procedează conform indicației 4b).

9. Privind lateral, se coboară atent tubul microscopului manipulând butonul mișcării grosiere până la contactul lentilei frontale a obiectivului cu picătura de ulei cât mai aproape de lamă.

10. Privind prin ocular(e), se prinde imaginea, manipulând lent, progresiv, numai de jos în sus, tubul microscopului prin butonul mișcării grosiere. Se focalizează imaginea prin butonul mișcării fine. În raport cu necesitățile se ameliorează iluminarea conform indicațiilor 5 și 6.

4.2.2. Întreținerea microscopului

1. Se ține permanent microscopul la adăpost de praf, sub husă sau în cutie.

2. Obiectivele și ocularele nefolosite se păstrează în cutia lor.

3. Nu se atinge cu degetele lentilele și nu se apropie excesiv de ocular în cursul examinării, întrucât se pot lăsa pe lentile amprente și sebum de pe gene.

4. După fiecare examinare, se curăță uleiul de pe obiectivul cu imersie folosind o batistă curată de mătase, bumbac sau hârtie specială pentru lentile. În lipsă, se șterge lentila cu pulpa degetului și se șterge imediat degetul cu o bucată de tifon. Urmele uscate de ulei de cedru denaturează imaginea, sunt dificil de îndepărtat și alterează obiectivul.

Periodic:

5. Se șterg lentilele ocularelor cu o batistă de finet înmuiată cu amestec etanol—eter în părți egale, iar pentru îndepărtarea eventualelor pulberi sau scame din vecinătatea monturii lentilelor se folosește un penson.

6. Se curăță fața frontală a obiectivelor, în special a celui cu imersie, și a condensorului cu o batistă de finet umezită cu benzină sau xilol (și niciodată cu alcool pentru că solvă cleiul cu care sunt montate lentilele).

4.2.3. Dificultăți frecvente în microscopie

Cele mai multe sunt legate de examenul cu imersia.

1. Imposibilitatea de a focaliza imaginea:

■ Obiectivul poate avea urme uscate de ulei de cedru de la examinări anterioare neglijente. Se curăță obiectivul.

■ Uleiul de cedru este prea vâscos, lama aderă la obiectiv și este antrenată pe verticală o dată cu acesta. Se schimbă uleiul de cedru.

■ Lama este pusă cu frotiul în jos. Se corectează poziția lamei.

■ Preparatul este acoperit cu ulei de cedru uscat sau cu o lamelă mai groasă decât cea pentru care este corectat obiectivul. Se introduce preparatul în baie de xilol pentru spălare sau îndepărtarea lamei.

Dacă nici una din eventualități nu se verifică, se schimbă obiectivul. O imagine bună indică o defecțiune a primului obiectiv, de competența exclusivă a opticianului.

2. Claritatea imaginii este perturbată de:

■ O umbră care trece prin câmpul microscopic. Uleiul de cedru are o bulă de aer. Se ridică tubul microscopului, apoi se reia focalizarea imaginii. Dacă incidentul se repetă, se șterge uleiul de pe preparat și de pe lentila obiectivului și se reia operația cu o nouă picătură de ulei.

■ Pulberi sau impurități. Privind prin ocular, se reperează poziția acestora pe lentilele ocularului sau obiectivului (imprimă mișcări de rotație pieselor respective) ori preparatului (se examinează câmpuri succesive). Se curăță lentilele sau preparatul.

3. Iluminarea defectuoasă a câmpului microscopic:

■ Luminare neuniformă. Se controlează centrarea luminii; dacă nu este în cauză, se controlează declicul de poziționare a obiectivului în revolver.

■ Semiobscuritate. Se controlează pe rând centrarea luminii, dacă apertura numerică a obiectivului nu este mai mare decât a condensorului sau dacă este fixat corect condensorul în montură. Se remediază.

■ Strălucire supărătoare a imaginii. Se controlează deschiderea diafragmei de câmp, iar în absența acesteia se coboară condensorul.

4.2.4. Examenul între lamă și lamelă la microscopul cu câmp luminos

Indicații: Depistarea și observarea fungilor și protozoarelor; observarea mobilității bacteriilor.

Principiu: Structurile celulare native sunt incolore și puțin refringente în raport cu mediul de suspensie. La microscopul cu fond luminos devin vizibile numai mărind contrastul imaginii prin reducerea diafragmei de apertură. Dar aceasta reduce puterea de rezoluție a microscopului prin utilizare parțială a aperturii obiectivului. Deci preparatele native examinate la microscopul cu fond luminos sunt sărace în detalii. În asemenea preparate detaliile morfologice și structurale pot fi observate numai prin metode speciale de iluminare; microscopia cu fond negru (vezi 4.3.1) sau cu contrast de fază (vezi 4.3.2), care folosesc integral apertura obiectivului.

Procedura:

1. Pe o lamă de microscop curată se depune o picătură din suspensia microbiană de cercetat și se acoperă cu o lamelă ale cărei margini au fost unse în prealabil cu ulei de parafină, pentru a evita evaporarea lichidului în cursul examenului.

2. Se așază preparatul pe masa orizontală a microscopului.

3. Se alege obiectivul adecvat și se reglează iluminarea cu închiderea diafragmei de apertură până la obținerea celui mai bun contrast. Dacă nu se folosește sistem de iluminare cu diafragmă de câmp, contrastul poate fi mărit și prin coborârea condensorului.

4. După examinare, se depune preparatul într-un recipient cu soluție dezinfectantă.

Aprecierea microscopică a mobilității microorganismelor trebuie să fie prudentă:

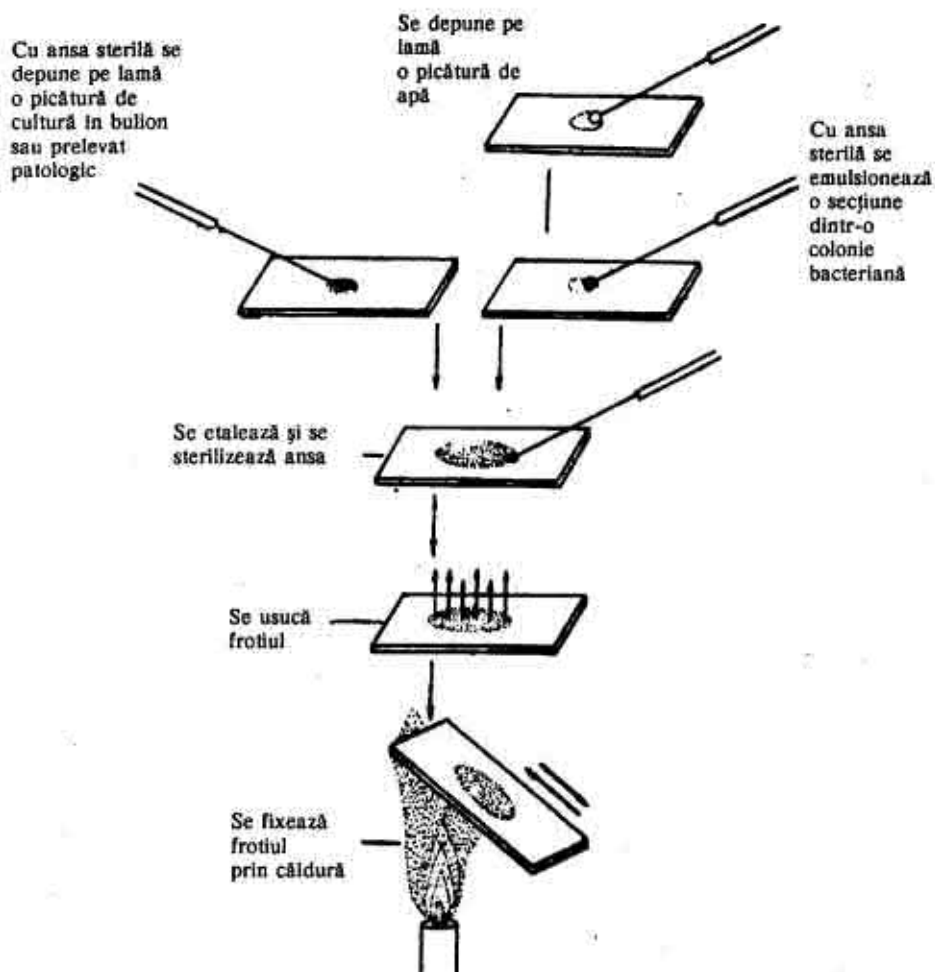


Fig. 4.5. Etapele succesive ale efectuării unui frotiu

- un organism este mobil când își modifică poziția față de un reper din vecinătate;
- curenții de lichid antrenează o mulțime de particule în aceeași direcție;
- mișcarea browniană apare ca o oscilație pe loc a particulelor observate.

4.2.5. Preparate microscopice colorate

4.2.5.1. Efectuarea frotiului

Frotiul este materialul microbial (produs patologic, cultură) etalat în strat subțire pe suprafața unei lame speciale de sticlă în vederea microscopiei. Pentru frotiuri folosim lame de microscop curate, degresate și marcate la o extremitate cu indicativul materialului microbial examinat. Efectuarea frotiului cuprinde trei timpi (figura 4.5):

1. *Etalarea*. O ansă de produs microbial fluid este întinsă în strat cât mai subțire și uniform pe o suprafață de 1–2 cm² în centrul lamei. Similar, o secțiune dintr-o colonie

bacteriană pe mediu solid, prelevată cu acul, poate fi suspensionată într-o picătură de apă în centrul lamei. La etalare ansa și acul se manipulează cu mișcări lente pentru a nu crea aerosoli contaminanți la rușeri bruște ale peliculei de lichid.

Cu fragmentele de țesături se efectuează *amprente*: pe suprafața de secțiune a probei se aplică lama pentru ca în porțiunea ei centrală să rămână amprenta subțire a țesutului.

2. *Uscarea* frotiului se face la temperatura camerei, dar mai indicat este să fie grăbită în aer cald sau pe platină încălzită la 75°C.

3. *Fixarea* face frotiul mai aderent la lamă, ameliorează colorabilitatea structurilor celulare și omoară microorganismele. Pentru studiul bacteriilor și multor fungi uzuală este fixarea prin căldură. Lama, cu frotiul uscat în sus, se înfierbântă trecând-o de 2—3 ori, cca 5 secunde, prin flacăra unui bec de gaz. Pentru studiul protozoarelor este indicată fixarea cu alcool metilic.

4.2.5.2. Metode de colorare

Colorarea frotiurilor realizează un contrast mai bun între microbi și fondul preparatului decât cel din preparatele umede; detaliile morfologice devin net mai vizibile.

În bacteriologie se utilizează coloranți bazici (săruri ale unei baze colorate cu un acid incolor) derivați de pararozanilină (violet de metil, fucsina bazică ș.a.) sau tionină (albastru de metilen) care au mare afinitate pentru acizii nucleici abundenți în celula bacteriană. Soluțiile apoase de colorant se alterează în timp, de aceea se prepară în cantități limitate pornind de la soluția alcoolică saturată.

Soluția alcoolică saturată a coloranților bazici

Colorant (fucsina bazică,
albastru de metilen etc.) 10 g

Alcool etilic de 96° 100 ml

Se mojarăază colorantul cu o parte din alcool și se transvazează într-un flacon cu dop rodat. Pentru a spăla din mojar restul de colorant, se adaugă treptat, în porțiuni mici, restul de alcool și se transvazează în flacon. Se menține flaconul la 37°C timp de 7 zile cu agitare la intervale. Filtratul prin hârtie este soluția alcoolică saturată a colorantului, care se conservă la întuneric în flacoane ermetic închise.

Colorații simple, cu un singur colorant.

Indicații: Permit numai observarea morfologiei bacteriilor (figura 4.6), dar oferă detalii structurale ale celulelor inflamatorii. Se recomandă colorațiile cu albastru de metilen. Cea cu albastru de metilen policrom este colorația de elecție pentru identificarea *Bacillus anthracis* direct în prelevate patologice.

Necesar:

1. Soluție de albastru de metilen Loeffler

Soluție alcoolică saturată
de albastru de metilen 30 ml

Soluție 1%
de KOH 1 ml

Apă distilată 100 ml

2. Soluțiile de albastru de metilen policrome se obțin prin învechirea soluției de albastru de metilen sau prin tratare cu borax.

Se păstrează soluția de albastru de metilen Loeffler minimum 12 luni în flacon

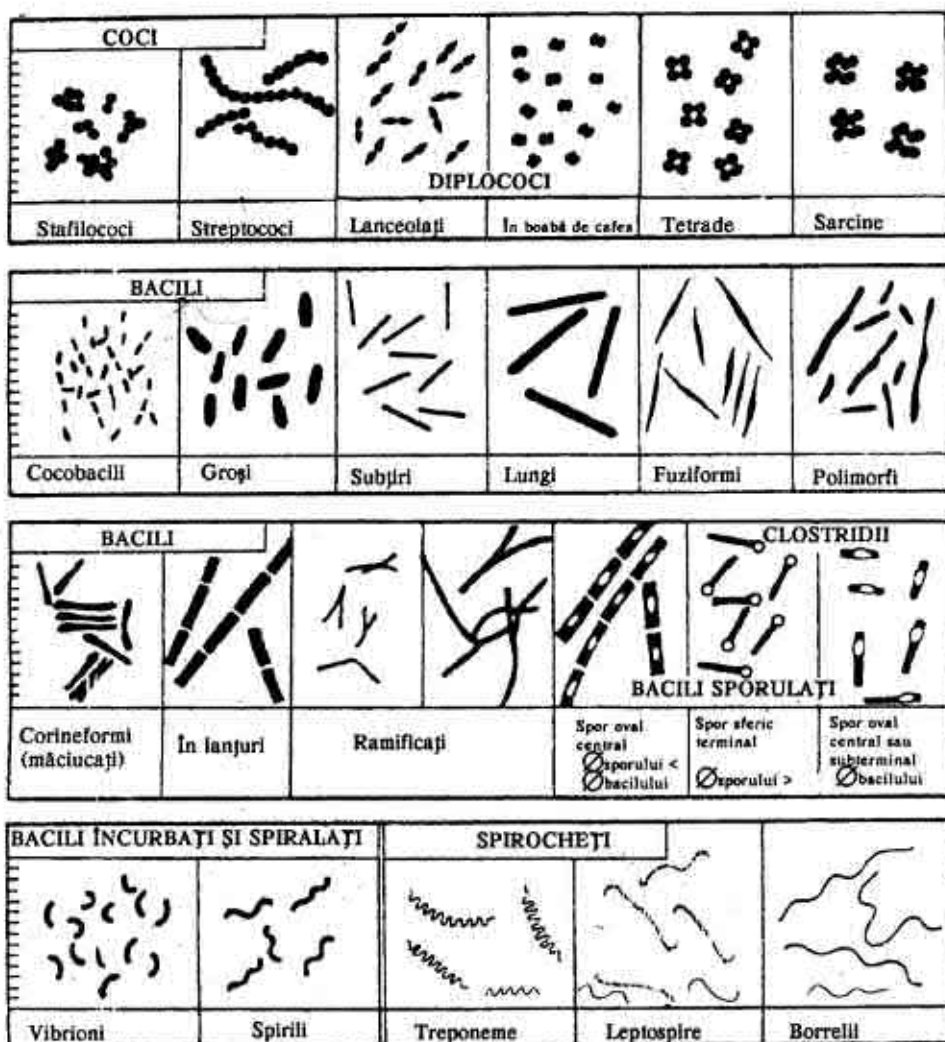


Fig. 4.6. Morfologia bacteriilor (forme și așezări celulare)

semiînchis cu agitare la intervale pentru a asigura aerarea conținutului. Prin oxidare albastrul de metilen formează un compus violet cu proprietăți policrome.

Soluția de albastru de metilen-borax (Masson)

Albastru de metilen 20 g

Borat de sodiu (borax) 50 g

Apă distilată 1000 ml

Se încălzește în balon de sticlă incoloră, până la solvire, amestecul de borax și apă. Se solvă albastrul de metilen în soluția de borax caldă. Se menține soluția astfel preparată timp de 2—4 zile la 37°C în termostat și 6—8 zile pe masă, la lumină cu agitare la intervale.

Procedura:

1. Se pune lama cu frotiul în sus pe stativul de colorare.
2. Se acoperă lama cu soluția de albastru de metilen aleasă și se lasă 1—3 minute pentru colorare. Nu există pericol de supracolorare.
3. Se spală lama cu apă de robinet.
4. Se absoarbe excesul de apă între două sugative (hârtie de filtru). Se usucă lama în poziție verticală și se examinează la microscop.

Interpretare: Bacteriile și celulele inflamatorii din exsudate apar colorate în albastru. Albastrul de metilen policrom colorează în roz capsula și materialul capsular al *Bacillus anthracis*.

Colorațiile diferențiale evidențiază în afară de morfologie și reacțiile de culoare ale bacteriilor. Colorațiile Gram și Ziehl-Neelsen sunt cele mai uzuale colorații în bacteriologie. Reacțiile de culoare ale bacteriilor sunt condiționate de diferențe în structura și compoziția chimică ale pereților bacterieni.

Colorația Gram. Principiu: Unele bacterii sunt capabile, în prezența iodului, să «fixeze» coloranții violeti de pararozanilină (cristal violet, violet de metil) și rezistă la decolorarea cu alcool sau cu acetona; altele nu realizează această fixare, se decolorează, și pentru a le observa trebuie recolorate. Dacă recolorarea se face cu un colorant diferit (de exemplu, fucsină bazică, safranină etc.), se realizează diferențierea microscopică a celor două categorii de bacterii:

- bacteriile grampozitive, care rezistă la decolorare și rămân colorate violet;
- bacteriile gramnegative, care se decolorează și necesită a fi recolorate în roșu.

Indicații: Identificarea preliminară a bacteriilor prin diferențierea diferitelor categorii morfologice în grampozitive și gramnegative.

Există mai multe modificări ale colorației descrise originar de Christian Gram în 1884. Recomandăm versiunea lui Jensen.

Necesar:

1. Soluția colorantă:

Violet de metil 6B

sau

Cristal violet, 85—90% colorant 5 g

Apă distilată 1000 ml

Se agită pentru solvare și se filtrează prin hârtie. Soluția este stabilă, dar trebuie filtrată înainte de folosire.

2. Soluția iodo-iodurată (Lugol) pentru mordansare:

Iod sublimat 10 g

Iodură de potasiu 20 g

Apă distilată 1000 ml

Iodura de potasiu se solvă în cca 50 ml apă, se adaugă iodul și se agită până la solvarea totală. Se completează la 1000 ml cu apă distilată. Se păstrează soluția în flacon brun.

3. Decolorantul:

Alcool etilic 96°, pentru decolorare lentă

Acetonă, pentru decolorare rapidă

Amestec de alcool etilic 96° 3 părți, acetonă 1 parte, pentru decolorare intermediară

4. Soluții recolorante recomandate

Soluție de roșu neutru	0,1%
Roșu neutru	1 g
Acid acetic soluție 1%	2 ml
Apă distilată	1000 ml

Se agită pentru solvire și se filtrează prin hârtie.

Soluție de safranină 0,5%	
Soluție de safranină stock	
Safranină, 99% colorant	2,5 g
Alcool etilic 96°	100,0 ml
Soluția de lucru	
Soluție de safranină stock	20 ml
Apă distilată	80 ml

Procedura:

1. Se colorează cu soluție 0,5% violet de metil sau cristal violet cca 30 secunde.
2. Se varsă colorantul și, ținând lama înclinată, se picură soluție Lugol pentru spălarea colorantului de pe frotiu și antrenarea depozitelor cristaline formate în amestecul colorant—iod.

Se acoperă lama cu soluție Lugol proaspătă și se lasă să acționeze cca 30 secunde.

3. Se scurge soluția Lugol și se spală frotiul cu alcool etilic de 96°, decolorant recomandat de Jensen. Se acoperă imediat frotiul cu alcool etilic proaspăt și se dă lamei mișcări alternative de inclinare până când preparatul nu mai eliberează colorant (se urmărește decolorarea pe fond alb). În acest moment se spală cu apă de robinet. Decolorarea cu etanol durează câteva secunde.

Acetona decolorează mai rapid, dar diferențierea este mai bună. Se acoperă lama cu acetonă și se spală după 2 secunde. Pentru a evita supradecolorarea, apa trebuie să curgă deja prin robinet în momentul în care începe decolorarea. Este un decolorant pretențios, care cere experiență pentru utilizare.

Amestecul alcool—acetonă realizează o decolorare satisfăcătoare în cca 5 secunde.

4. Se recolorează 1—2 minute cu soluție 0,1% de roșu neutru sau 30 secunde cu soluție 0,5% safranină ori 0,1% fucsină bazică.

NOTĂ. Uneori se utilizează pentru recolorare fucsina fenicată Ziehl (vezi mai jos) diluată 1/10. Nu se indică, deoarece colorează atât de intens bacteriile gramnegative, încât le poate face greu distincte de cele grampozitive.

5. Se spală, se absoarbe excesul de apă, se usucă și se examinează cu imersia.

Interpretare: Bacteriile grampozitive apar violet, cele gramnegative și celulele roșii; filamentele de fibrină sunt violet.

Martori:

Pozitiv: *Bacillus megatherium* sau *Staphylococcus aureus*.

Negativ: *Escherichia coli*.

Se efectuează un frotiu din amestecul, în părți egale, al suspensiilor, cu densitate corespunzătoare etalonului 3 al scării Mac Farland, din cultura peste noapte pe agar nutritiv de *B. megatherium* sau *S. aureus* și de *E. coli*. Aceste suspensii autoclavate 20 minute la

121°C pot fi utilizate indefinit. Pe frotiul martor diferențierea între bacteriile grampozitive și cele gramnegative trebuie să fie netă.

Frotiurile din prelevate patologice nu pot fi etalate întotdeauna uniform. În consecință, pe asemenea frotiuri câmpurile bine diferențiate pot alterna cu câmpuri sub- sau supradecolorate. Se alege pentru examinare numai câmpuri cu leucocite roșii; dacă alături de acestea se observă și bacterii grampozitive, câmpul este corect diferențiat.

Colorația Ziehl-Neelsen

Principiu: Micobacteriile, spre deosebire de toate celelalte bacterii, datorită prezenței în peretele celular a unor substanțe ceroase, se colorează la cald cu fucsină fenicată și rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluați și cu alcool.

Indicații: Depistarea și identificarea micobacteriilor.

NOTĂ: Pentru bacilii leprei trebuie modificată (vezi mai jos).

Necesar:

1. Soluția de fucsină fenicată Ziehl

Soluție alcoolică saturată de fucsină bazică 10 ml

Soluție 5% (v/v) fenol în apă distilată 100 ml

Se topește fenolul în baie de apă la 56°C. Peste volumul măsurat de apă distilată caldă se adaugă, cu o pipetă prevăzută cu o propipetă volumul necesar de fenol topit. Se agită. Se amestecă soluțiile, se omogenizează și se filtrează prin hârtie.

2. Soluția decolorantă de acid—alcool

Acid clorhidric concentrat 35% 3 ml

Alcool etilic 96° 97 ml

3. Soluția recolorantă de albastru de metilen Loeffler.

Procedura:

1. Se pune pe lamă o bandă de hârtie de filtru ușor mai mare decât dimensiunile frotiului și se acoperă lama cu soluție de fucsină fenicată Ziehl. Se încălzește soluția colorantă plimbând pe sub lamă o flacăra (lampă de spirit sau tampon de vată înfășurat pe sârmă și îmbibat cu spirit) până la emiteră de vapori. Din acest moment se menține 5 minute lama pe stativ fără a mai fi încălzită.

2. Se îndepărtează banda de hârtie de filtru și se spală lama abundant cu apă de robinet.

3. Se decolorează frotiul repetat cu alcool clorhidric până când decolorantul care se scurge de pe lamă rămâne incolor (cca 2 minute ori mai mult în cazul frotiurilor mai groase).

4. Se spală abundant lama cu apă de robinet.

5. Se recolorează 1 minut cu soluție de albastru de metilen Loeffler.

6. Se spală lama cu apă de robinet, se absoarbe excesul de apă, se usucă și se examinează la microscop cu imersia.

NOTĂ: Bacilii acidorezistenți pot fi transferați de pe un frotiu pe altul prin hârtia de filtru care absoarbe excesul de apă. De aceea se folosesc bucăți de hârtie cu utilizare unică.

Interpretare: Bacilii acidorezistenți apar roșii strălucitori, iar alte bacterii și celulele din prelevatele patologice, albastre.

Colorația Ziehl-Neelsen modificată pentru bacilii leprei și nocardii.

Comparativ cu bacilii tuberculozei, aceste organisme sunt mai slab acidorezistente. Modificarea privește numai decolorarea, care se face după cum urmează:

- se acoperă frotiul cu alcool etilic 50° până se îndepărtează excesul de fucsină fenicată;
- se spală cu apă de robinet;
- se decolorează 3 minute cu soluții 5% de acid sulfuric pentru bacilii leprei, 1% pentru nocardii din prelevate patologice sau 0,5% pentru nocardii din cultură.

4.3. METODE SPECIALE DE MICROSCOPIE OPTICĂ

4.3.1. Microscopia cu fond negru

Indicații: Examen electiv pentru depistarea rapidă a spirochetelor, organisme foarte fine, puțin refringente și mobile, care nu pot fi observate la preparate microscopice uzuale.

Principiu: Metoda se bazează pe fenomenul descris de John Tyndall: într-o cameră obscură particulele de praf, care în condiții de iluminare obișnuită rămân invizibile, când se află în calea unei raze de lumină, care nu este direcționată spre ochiul observatorului (condiție a obscurității), devin vizibile prin lumina difractată și reflectată difuz pe suprafața lor, și indică astfel observatorului traiectoria acestei raze.

Condensorul pentru câmp întunecat oprește accesul spre obiectiv a razelor de lumină directe (creează fondul întunecat) și iluminează oblic obiectul. Parte din razele difractate și reflectate de către obiectul iluminat oblic pătrund în obiectiv și formează imaginea luminoasă a obiectului pe fondul negru al câmpului. Un astfel de condensor este condensorul cu oglinzi sferice concentrice (figura 4.7). La microscopia pe fond negru obiectul flotează într-o peliculă de lichid pentru a evita reflexia totală a razelor înainte ca acestea să-l lumineze.

Necesar:

1. Condensor cu oglinzi sferice concentrice, care înlocuiește condensorul pentru câmp luminos la un microscop optic.

2. Sursă de lumină cu mare intensitate și diafragma iris.

3. Lame de microscop cu grosimea de 1,0 mm. Numai pe asemenea lame preparatul este plasat în focalul condensorului (distanța focală de 1,2 mm).

4. Ulei de cedru.

5. Cameră obscură.

Procedura:

1. Se centrează diafragma de câmp folosind condensorul de câmp luminos și obiectivul 10X (vezi 4.2.1., 4b).

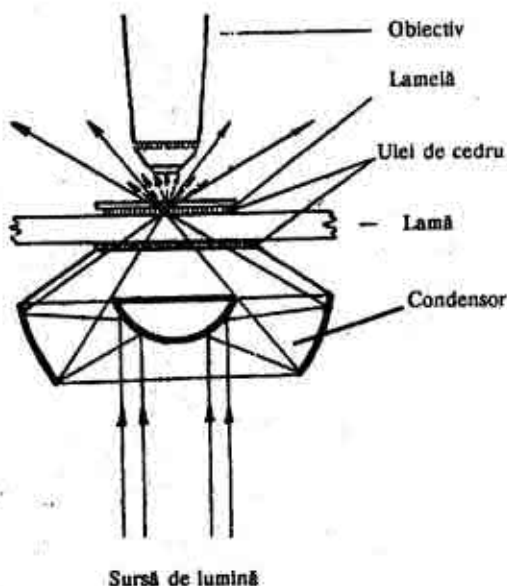


Fig. 4.7. Condensorul cu oglinzi sferice concentrice pentru iluminarea cu fond întunecat

2. Se înlocuiește condensorul de câmp luminos cu cel pentru iluminarea cu fond negru.
 3. Se depune o picătură de ulei de cedru pe lentila superioară a condensoului, ridicată la nivelul mesei portobiect.
 4. Se pune preparatul între lamă și lamelă peste picătura de ulei de cedru de pe lentila condensoului.
 5. Se examinează preparatul cu obiectivul 10X apoi, cu un obiectiv uscat mai puternic, după necesitate. Cu cât obiectivul are o apertură mai mare fondul câmpului microscopic este mai puțin întunecat. De aceea pentru examinare cu imersia trebuie folosit un obiectiv prevăzut cu diafragma iris.
 6. După examinare, se depune preparatul într-un recipient cu soluție dezinfectantă.
- Interpretare:* Pe fondul negru al câmpului microscopic se observă imaginea (figura 4.8) luminoasă, strălucitoare a spirochețelor mobili.

4.3.2. Microscopia cu contrast de fază

Indicații: Observarea rapidă în preparate native, folosind toată apertura obiectivului și puterea de rezoluție a microscopului, a protozoarelor (flagelate, rizopode, ciliate), a fungilor, a fagocitelor și a efectului citopatic al virusurilor în culturi de celule cu detalii structurale care în alte condiții pot fi observate numai prin colorații speciale, dificile. În bacteriologie microscopia cu contrast de fază este utilă doar pentru observarea creșterii și diviziunii bacteriene sau a mișcării flagelilor.

Principiu: Interferența dublează intensitatea luminoasă a două raze în concordanță de fază și anulează lumina a două raze în opoziție de fază (defazare cu $1/2$ din lungimea de undă).

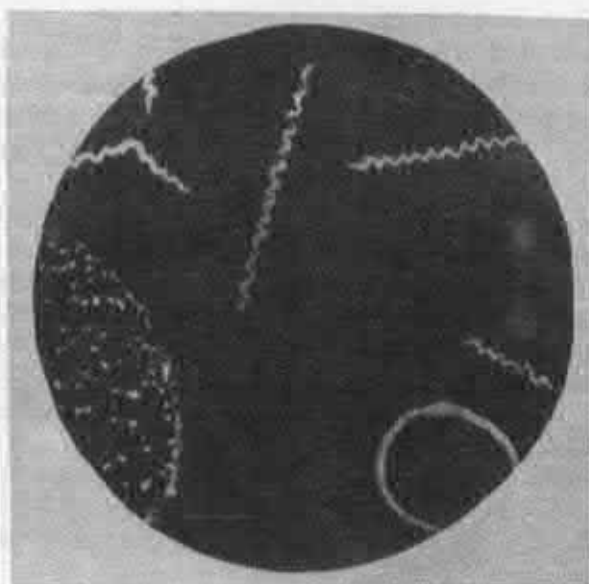


Fig. 4.8. Microfotografia unui preparat examinat pe fond negru: *Treponema pallidum* în serozitatea șancrului sifilitic.

Ochiul sesizează ușor aceste diferențe extreme în intensitatea fluxului luminos. La trecerea printr-un obiect transparent (de exemplu, o celulă) razele refractate și difractate suferă numeroase defazări intermediare între situațiile extreme menționate mai sus. Aceste defazări intermediare oscilează în jurul a $1/4$ din lungimea de undă și nu sunt sesizate la microscopia cu fond luminos fiind mascate de razele directe.

Microscopul cu contrast de fază permite observarea integrală a detaliilor din imaginea obiectului formată în planul focal superior al obiectivului prin interferența razelor directe cu cele refractate în preparat. Pentru aceasta o diafragmă inelară, plasată sub condensor, reduce fascicolul razelor

directe, iar o *placă de fază*, plasată în planul focal superior al obiectivului, absoarbe parțial razele directe și accentuează defazarea razelor refractate și difractate în obiectul examinat (figura 4.9).

Necesar:

1. *Condensor special* care încorporează în partea inferioară un disc rotativ prevăzut cu o serie de diafragme inelare. Acestea sunt runde de sticlă opacifiată, dar cu un inel îngust de sticlă clară pentru accesul fluxului luminos. Diametrul inelului este individualizat în raport cu apertura fiecărui obiectiv: de la 4,5 mm pentru obiectivul 10X până la cca 18 mm pentru obiectivul 90X (figura 4.9).

2. *Obiective de fază*. Obiective obișnuite care în planul focal superior au montată o placă de fază formată dintr-o rondelă de sticlă. Razele directe trec printr-un șanț circular, ușor metalizat, care le absoarbe parțial. Razele refractate trec prin restul plăcii, mai gros, unde sunt defazate. Profunzimea șanțului este astfel calculată, încât defazarea razelor refractate în raport cu razele directe să fie de $1/4$ din lungimea de undă. În aceste condiții diferența de intensitate între raza directă și cea difractată se reduce și imaginea obiectului apare cu toate detaliile structurale.

Obiectivele de fază sunt identificate prin literele Ph gravate pe montură.

3. *Ocular de centrare*.

4. *Lampă* cu mare intensitate luminoasă.

5. *Filtru verde*.

Procedura:

1. Se montează condensorul și obiectivele pentru contrast de fază.

2. Se centrează lumina (vezi 4.2.1, 4b) folosind rondela 0 a condensorelui.

3. Se focusează obiectivul pe probă.

4. Se rotește sub condensor diafragma inelară corespunzătoare obiectivului.

5. Se înlocuiește ocularul cu ocularul de centrare, care permite observarea planului focal superior al obiectivului cu placa de fază.

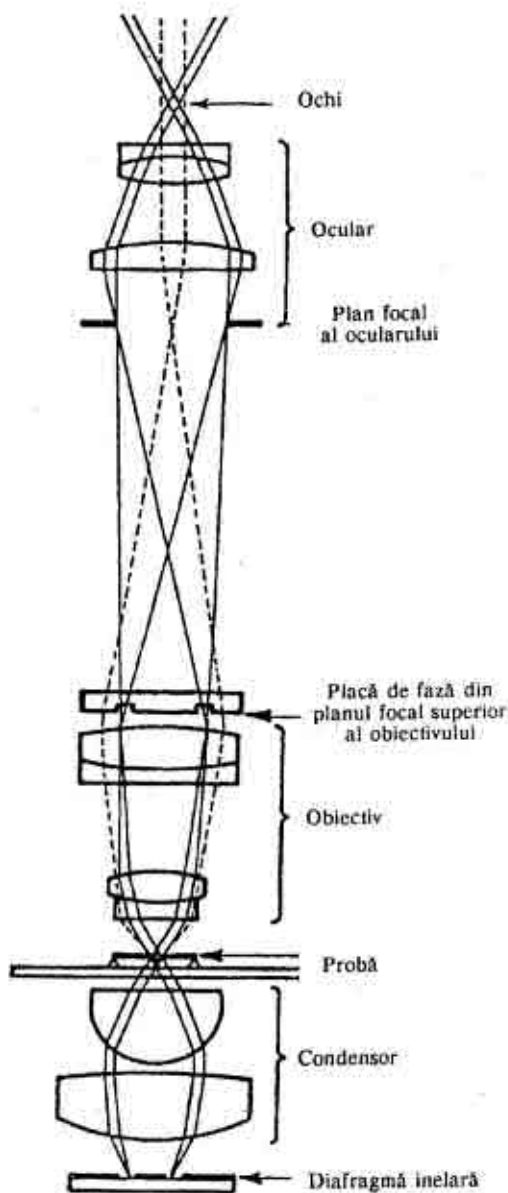


Fig. 4.9. Drumul razelor de lumină în microscopul cu contrast de fază; detalii privind diafragma inelară și placa de fază (adaptare după American Optical Company)

6. Privind prin ocularul de centrare și folosind șuruburile de centrare plasate sub condensor, se suprapune exact diafragma inelară cu inclul de fază.

7. Se reinserează ocularul obișnuit și se examinează.

Interpretare: Pe fondul cenușiu al câmpului microscopic se observă imaginea obiectului cu detalii structurale net distincte. Examenul în cameră obscură și utilizarea filtrului verde favorizează observarea detaliilor.

4.3.3. Microscopia cu fluorescență

Indicații: Colorația fluorescentă este utilă pentru depistarea rapidă a bacililor acidorezistenți pe frotiuri din spută și secțiuni tisulare. Utilizări mai largi are colorația imunofluorescentă pentru depistarea și identificarea rapidă a microorganismelor în prelevate patologice, a unor anticorpi din ser, a imunoglobulinelor, complementului, hormonilor sau enzimelor în țesuturi, a antigenilor de transplant în țesuturi, a antigenilor tumorali în țesuturi neoplazice.

Principiu: Luminescența este fenomenul prin care o substanță absoarbe radiații ultraviolete din domeniul apropiat spectrului vizibil (radiația de excitație) și emite o radiație cu lungime de undă mai mare, respectiv o radiație luminoasă. Durata iluminării după încetarea acțiunii radiației de excitație împarte substanțele luminescente în fluorescente (iluminarea ulterioară durează mai puțin de 10^{-7} secunde) și fosforescente (iluminarea ulterioară durează mai mult de 10^{-7} secunde). Mai multe substanțe naturale sunt fluorescente: minereuri de uraniu, uleiuri, picături de grăsime etc.

Fluorocromii sunt coloranți fluorescenți. Așa sunt: auramina O, acridin-oranjul R, tripaflavina etc. În funcție de fluorocrom, lumina emisă variază de la albastră la roșie sau albă. Un interes aparte prezintă fluorocromii care sunt stabili în soluții apoase neutre și se pot lega covalent de anticorpi, făcând conjugatul fluorescent: izotiocianatul de fluoresceină (fluorescență verde) și lisaminrodamina B (fluorescență portocalie).

Microorganismele colorate fluorescent sau imunofluorescent pot fi observate în condiții speciale de microscopie.

Necesar:

1. Sursă de lumină. Cea mai indicată este o lampă din sticlă de cuarț cu vapori de mercur, tip HBO, care emite radiații ultraviolete, luminoase și calorice.

2. Set special de filtre:

- filtru caloric, care absoarbe radiațiile calorice emise de lampă;
- filtre de excitație, care permit accesul spre preparat numai a radiațiilor cu lungime de undă mică (ultraviolete, violete sau albastru-închis), radiațiile de excitație;
- filtre de baraj (de protecție), care opresc radiațiile de excitație, nocive pentru ochi, dar sunt permeabile pentru lumina emisă de fluorocromi (de la verde la roșie).

3. Condensator pentru fond negru, care, prin dispersia laterală a razelor incidente, mărește contrastul imaginii mai mult decât condensatorul de câmp luminos.

4. Lame subțiri de 1,0 mm.

5. Obiective acromate (obiectivele apocromate pot avea sticlă fluorescentă), care au obiectiv cu imersie dotat cu diafragmă iris.

6. Lichid de imersie nefluorescent cu vâscozitate redusă, care nu se usucă, pentru contactul între lamă și condensor și pentru obiectivele 60X, 90X sau 100X, de exemplu glicerina neutră tamponată, dimetilftalat sau un ulei nefluorescent.

7. Camera obscură.

Procedura:

1. Se montează la microscop dispozitivul monocular, singurul care valorifică integral fluxul luminos fluorescent evitând diviziunea în prisma dispozitivului binocular.

2. Se montează condensorul pentru fond negru.

3. Se montează filtrele calorice, de excitație și de baraj conform schemei din figura 4.10. Filtrele de excitație și de baraj se aleg ținând cont de lungimile de undă ale radiațiilor absorbite, respectiv emise maximal de fiecare fluorocrom utilizat.

4. Se plasează preparatul microscopic pe masa portobiect a microscopului ca pentru un examen pe fond negru.

5. Se alege obiectivul corespunzător măririi dorite.

6. Se prinde și se focusează imaginea, iradiind preparatul timpul strict necesar pentru aceste operații și observații. Iradierea excesivă, prin efect fotodinamic, reduce intensitatea emisiunii de lumină din preparat.

7. Se îndepărtează primul preparat lăsând obiectivul pe loc. Aceasta va scurta timpul necesar focusării următoarelor preparate.

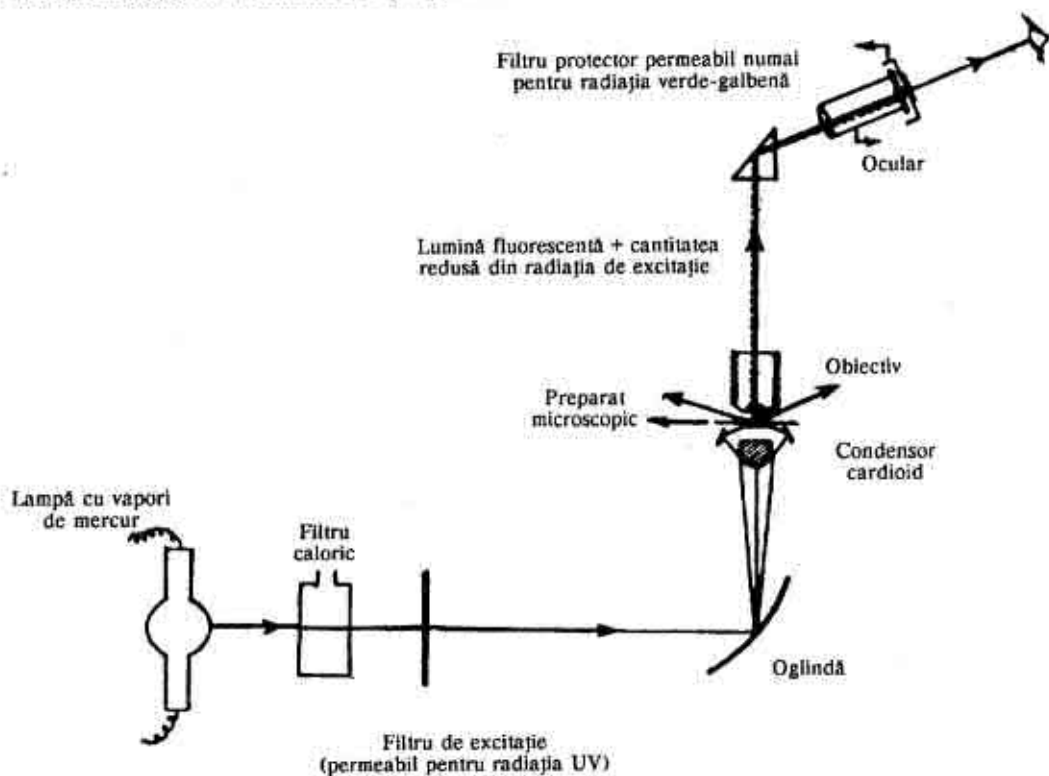


Fig. 4.10. Schema optică a microscopului cu fluorescență

Microscopul cu fluorescență modernă iluminează preparatul de sus în jos, permit utilizarea lamelor portobiect cu diferite grosimi, evită laborioasa punere la punct a imaginii cu condensorul de fond negru și utilizează cu randament mai mare radiația de excitație.

Interpretare: Se ține cont de morfologia organismelor observate, fluorocromul utilizat, intensitatea fluorescenței și aspectul fondului.

Colorația fluorescentă pentru bacilii acidorezistenți.

Principiu: Micobacteriile fixează auramina, se colorează fluorescent și rezistă la decolorarea cu acid-alcool.

Indicații: depistarea rapidă a bacililor acidorezistenți pe frotiurile din spută (bacilii fluorescenți sunt vizibili și cu un obiectiv uscat, care, prin profunzimea mare, permite examinarea rapidă a unor suprafețe mai mari de frotiu decât unul cu imersie).

Necesar:

1. Soluție de auramină fenicată:

Auramină O	0,3 g
Soluție 3% fenol în apă distilată	100 ml

2. Soluția decolorantă de acid-alcool:

Acid clorhidric concentrat	0,5 ml
Clorură de sodiu	0,5 g
Alcool etilic 96°	75,0 ml

3. Soluția de spălare finală

Permanganat de potasiu	0,1 g
Apă distilată	100,0 ml

Procedura:

1. Se colorează frotiul 4 minute cu soluția de auramină fenicată.
2. Se spală cu apă de robinet.
3. Se decolorează cu acid-alcool 4 minute.
4. Se spală cu soluția de permanganat.
5. Se usucă și se examinează la microscopul pentru fluorescență cu obiectivul 20X, ocazional cu obiectivul 40X, pentru a verifica morfologia organismelor fluorescente reperate.

Interpretare: Bacilii acidorezistenți apar galbeni-strălucitori, resturile celulare, ne-specific fluorescente, sunt galbene-pal pe fondul negru al preparatului. În caz de dubiu, mai ales când microscopia nu este urmată de cultivarea probei, se verifică rezultatul pozitiv prin colorație Ziehl-Neelsen, efectuată în continuare pe același frotiu.

Martori:

Pozitiv: *Mycobacterium tuberculosis*

Negativ: *Corynebacterium* sp.

4.4. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Microscopia electronică oferă imagini cu detalii de structură a celulelor până la nivel molecular, iar în microbiologia clinică se folosește doar la depistarea rapidă a anumitor

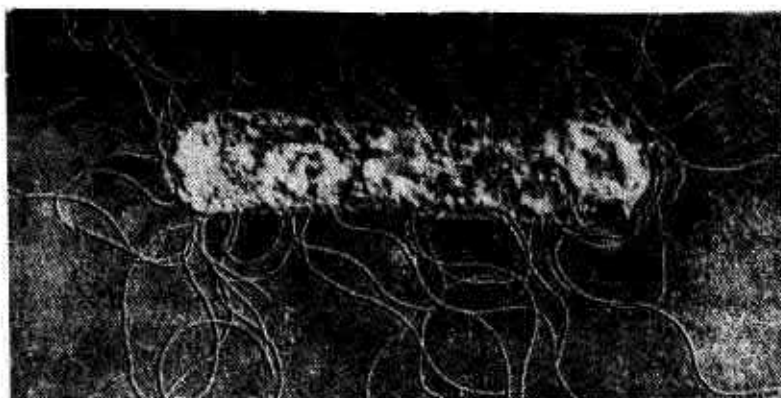


Fig. 4.11. *Proteus vulgaris*, un bacil peritrich (9.000X), electronmicrografie cu transmisie, observați efectele tridimensionale obținute prin umbrire (după A. Ouwink și W. van Herson, 1950)

virusuri, fără a fi accesibilă celor mai multe laboratoare. De aceea se va prezenta numai principiul metodei.

Microscopul electronic folosește pentru formarea imaginii un flux de electroni cu mare viteză, care are o lungime de undă foarte mică în comparație cu cea a fotonilor. De aici decurge marea putere de rezoluție a microscopului electronic.

Fluxul de electroni generat de catod, un filament de tungsten încălzit în vid, este accelerat în câmp de înaltă tensiune (25—125 kV), diafragmat și deflectat succesiv în câmpuri electromagnetice pentru focusare în planul preparatului și formarea imaginii care poate fi observată pe un ecran fluorescent sau înregistrată fotografic. Astfel într-un microscop electronic electromagneticii funcționează cu lentile condensor, obiectiv, intermediare și de proiecție.

Două tipuri de microscopie electronică sunt utilizate în microbiologie: microscopia electronică cu transmisie (MET) și microscopia electronică cu baleiaj (MEB).

4.4.1. Microscopia electronică cu transmisie

În MET fluxul accelerat de electroni trece prin preparatul microscopic foarte subțire și cu contraste accentuate prin umbrire sau colorație negativă. Pregătirea preparatului microscopic este foarte laborioasă și presupune, în ordinea enunțată, următoarele etape:

- Fixare cu glutaraldehidă, tetraoxid de osmiu sau acetat de uraniu.
- Deshidratare în etanol sau acetonă.
- Impregnare cu o rășină poliesterică sau epoxidică și polimerizare.
- Secționare la ultramicrotom a blocului de polimerizare pentru a obține secțiuni de cca 30 nm grosime.

■ Accentuarea contrastelor fie prin umbrire, fie prin colorare negativă. Umbrirea se face în vid cu metale grele ca aurul, platina, paladiul sau aliajele lor vaporizate și proiectate asupra preparatului în unghi de cca 30°, încât structurile examinate apar luminoase într-o parte și își proiectează umbra întunecată în partea opusă (figura 4.11). Colorarea negativă se face prin impregnarea preparatului cu sarea unui metal greu, de exemplu, fosfotungstat de potasiu. Structurile examinate apar luminoase în contrast cu fondul întunecat, format de materialul electronoopic.

Pregătirea materialului pentru secționarea ultrafină produce artefacte prin pierderea unor molecule proteice sau lipidice ori prin deformarea structurilor. Tehnicile noi de criofixare sau criodecapare evită aceste dezavantaje.

Criofixarea presupune congelarea bruscă a probei la -70° sau -170° urmată de: substituirea gheții prin soluția metanolică a fixatorului, înlocuirea substituentului prin acetonă și includerea finală în rășină polimerizabilă.

Criodecaparea, deși foarte pretențioasă, a permis progresele actuale în studiul ultrastructurii membranelor bacteriene și fungice. Tehnica impune o suită de operații sub vid înaintat: fracturarea blocului de congelare, sublimarea suprafeței de fractură pentru a dezveli detalii de structură, care sunt gravate prin depunerea unui strat fin de platină, apoi, din unghi diferit, a unuiia de carbon. Replica suprafeței de fractură în platină-carbon este apoi pregătită pentru examinare la microscopul electronic.

4.4.2. Microscopia electronică cu baleiaj

În MEB fluxul accelerat de electroni este focusat pe suprafața preparatului acoperită, prin vaporizare în vid, cu un strat subțire de metal sau carbon. Spotul de electroni baleiază cu mare viteză pe suprafața examinată. Electronii secundari eliberați de preparat sunt captați, iar semnalele amplificate și transformate în imagini de detalii structurale ale suprafeței examinate, care pot fi observate pe ecranul unui tub cinescopic sau înregistrate fotografic.

Deși MEB are rezoluția inferioară celei a MET, se folosesc tensiuni de accelerare mai mici și se oferă imagini în relief cu profunzime focală mare ale suprafeței unor preparate groase, opace pentru electroni.

METODA BACTERIOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

Izolarea bacteriilor în cultură pură necesită:

- un mediu de cultură repartizat în recipiente adecvate cultivării;
- instrumentar pentru însămânșarea bacteriilor și manipularea culturii;
- incubatoare care asigură temperaturile și atmosfera optime cultivării.

5.1. MEDIILE DE CULTURĂ ȘI CLASIFICAREA LOR

Mediile de cultură sunt soluții care asigură nutrienții și condiții fizico-chimice necesare creșterii și multiplicării bacteriilor. Totalitatea bacteriilor acumulate prin multiplicare într-un asemenea mediu e numită *cultură bacteriană*.

Mediului de cultură ideal i se cer următoarele calități:

- să asigure bacteriilor condiții de dezvoltare cât mai apropiate celor din mediul lor natural (organismul uman, animal, sol etc.);
- să nu conțină substanțe inhibitoare pentru bacteriile urmărite;
- să faciliteze observarea apariției și dezvoltării culturii (omogenitate, transparență, lăcuș al suprafeței etc.);
- să faciliteze izolarea bacteriilor în culturi pure (pH, osmolaritate etc.);
- să fie sterile.

5.1.1. Clasificarea după proveniența nutrienților

Se disting: medii empirice și medii sintetice.

Mediile empirice au la bază *extracte apoase* obținute fie la cald, fie prin infuzare, fie prin digestia cărnii, cordului, creierului sau ficatului de vită ai căror nutrienți (hidrocarburi, baze azotate, săruri minerale, factori de creștere etc.) sunt completați cu aminoacizi și peptide de diferite sorturi de *peptonă* (produși de hidroliză enzimatică ai proteinelor animale sau vegetale). Dacă osmolaritatea și pH-ul lor pot fi riguros controlate, calitățile nutritive pot varia de la un lot la altul de mediu. Mediile empirice sunt cel mai larg folosite pentru izolarea și studiul bacteriilor.

Mediile sintetice includ ingrediente chimic pure. Au compoziție minimă, riguros controlată și se folosesc pentru studiul necesităților nutritive și al metabolismului bacterian.

5.1.2. Clasificarea după consistență

Distingem: medii lichide, solide și semisolide.

În *mediile lichide* descendenții bacteriilor se amestecă unii cu alții, ceea ce nu permite obținerea de culturi pure decât din produse monobacteriene. Prin gelificarea mediilor lichide cu 2% agar-agar¹ se obțin *medii solide*, care, grație vâscozității lor, fixează bacteriile în punctul de înșămânțare. De aceea pe medii solide bacteriile formează colonii. O *colonie* este o aglomerare de bacterii care se dezvoltă dintr-o singură celulă sau grup de celule de același fel (unitate formatoare de colonie, abreviat U.F.C.) și este vizibilă cu ochiul liber pe suprafața mediului solid. O colonie este o clonă bacteriană, deci o cultură pură.

În vederea utilizării, mediile de cultură lichide sunt repartizate în eprubete sau în baloane, iar cele solide, în plăci Petri și în eprubete cu solidificare în pantă.

Mediile semisolide se obțin prin gelificare cu numai 0,4—1% agar. Repartizate în coloană se folosesc pentru depistarea mobilității bacteriilor și pentru conservarea unor tulpini bacteriene în laborator.

5.1.3. Clasificarea după compoziție

Se disting: medii simple și îmbogățite de uz general și medii speciale.

Mediile simple sau de bază sunt bulionul nutritiv, apa peptonată și agarul nutritiv. Conțin numai ingredientele de bază: extract de carne sau numai peptonă, clorură de sodiu, și permit creșterea numai a bacteriilor nepretențioase nutritiv, în majoritate saprofite ale mediului extern sau ale florei microbiene normale a corpului uman.

Mediile îmbogățite permit cultivarea celor mai multe bacterii patogene pretențioase nutritiv. Se obțin prin adăugarea de sânge, ser sangvin, glucoză, extract de levură etc. la mediile de bază. Geloza-sânge este mediul uzual de izolare a bacteriilor patogene.

Mediile speciale.

■ *Mediile speciale de izolare* permit izolarea anumitor microbi patogeni din prelevate hipercontaminate (materii fecale, exsudat faringian etc.); se utilizează medii de diferențiere și medii selective. *Medii de diferențiere* conțin substratul pentru o enzimă bacteriană caracteristică și un indicator, care evidențiază atacarea acestui substrat, deci un caracter metabolic diferențiază între ele bacteriile cu aspect al culturii identic pe mediile simple. De pildă geloza nutritivă cu albastru de bromtimol lactozat diferențiază enterobacteriaceele lactozopozitive de cele lactozonegative. *Mediile selective* conțin substanțe inhibitorii asupra altor bacterii decât acelea a căror izolare se urmărește. Pentru a facilita reperarea coloniilor unei anumite bacterii, mediile selective au și caracter diferențial. Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citrat de fier și hiposulfid de sodiu, adăugată cu lactoză și roșu neutru ca indicator de pH) pentru izolarea shigelelor și salmonelilor din materii fecale.

■ *Mediile de îmbogățire* sunt medii lichide care favorizează înmulțirea anumitor bacterii patogene și inhibă dezvoltarea florei de asociație dintr-un produs patologic. Înșămânțarea și incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare epuizării pe medii

¹

Coloid extras dintr-o algă marină, care se lichefiază la 80° și se gelifică la cca 40—45°C.

selective pentru izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociație abundentă.

■ Mediile de identificare conțin substratul activității unei enzime bacteriene și un indicator adecvat, care evidențiază modificarea substratului în cursul cultivării bacteriei cercetate. Bacteriile cu asemenea medii sunt folosite pentru identificarea bacteriilor. *Mediile multitest* permit investigarea mai multor caractere biochimice printr-o însămânțare unică.

5.2. TEHNICA ÎNSĂMÂNȚĂRILOR

Însămânțarea este depunerea în sau pe suprafața mediului de cultură a materialului bacterian, inoculum, în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea este însămânțarea într-un mediu de cultură proaspăt a unei bacterii dintr-o altă cultură fie în scopul purificării ei, fie pentru studiul activității biochimice.

Izolarea este operația prin care o bacterie este obținută în cultură pură.

Aceste operații se fac uzual cu ajutorul acului de însămânțare, mai rar, numai în cazurile speciale precizate mai jos, cu ajutorul unui etalor sau al pipetei.

5.2.1. Epuizarea semicantitativă a inoculului pe suprafața plăcilor Petri

Se utilizează ca metodă de selecție pentru izolarea în culturi pure a bacteriilor din produse plurimicrobiene.

Placa — «uscată» prin menținere cca 30 minute la 37°C cu capacul întredeschis pentru evaporarea condensului — se ține pe masa de lucru. Cu mâna stângă se întredeschide capacul. Ansa se ține în mâna dreaptă, ca un creion, oblic față de suprafața mediului și se plimbă ușor, pentru a evita zgăricirea acestuia.

Inoculumul este dispersat pe un sector limitat al plăcii cu ansa sterilă sau tamponul cu care a fost prelevat produsul microbial. Se resterilizează ansa; se verifică temperatura prin atingerea mediului în zonă neînsămânțată și se epuizează inoculumul în patru cadrane, descriind cu ansa striuri conform schemei din figura 5.1. Astfel în ultimele cadrane de epuizare se obțin colonii izolate, bine individualizate, la distanță de cca 1 cm unele de altele, iar creșterea poate fi apreciată semicantitativ (tabelul 5.1). Fiecare colonie bine individualizată pe un mediu neselectiv reprezintă practic o clonă. De aceea izolarea prin epuizarea inoculumului bacterian pe un mediu neselectiv mai poate fi numită și clonare.

Tabelul 5.1. Aprecierea semicantitativă a creșterii bacteriene după epuizarea inoculumului în patru cadrane pe suprafața mediului repartizat în placă Petri

Scorul de creștere	Colonii în aria de epuizare		
	I	II	III
+1	<10	—	—
+2	>10	<5	—
+3	>10	>5	<5
+4	>10	>5	>5

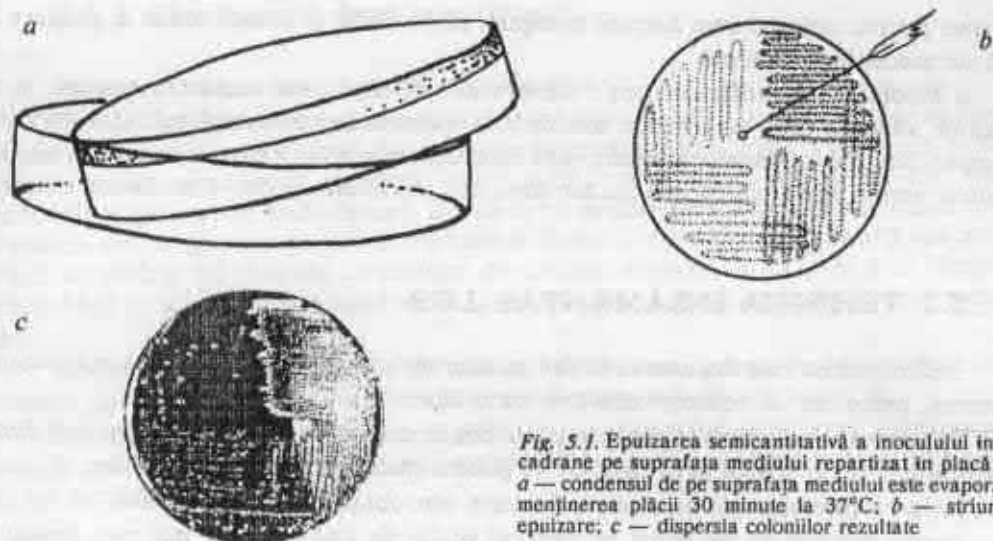


Fig. 5.1. Epuizarea semicantitativă a inoculului în patru cadrane pe suprafața mediului repartizat în placă Petri: a — condensul de pe suprafața mediului este evaporat prin menținerea plăcii 30 minute la 37°C; b — striurile de epuizare; c — dispersia coloniilor rezultate

La izolarea pe medii selective, inoculul trebuie să fie mai bogat decât pe mediile neselective (ansă cu buclă mai mare fără sterilizare după descărcarea pe primul cadran), iar primocultura de cele mai multe ori nu este pură: coloniile patogenului izolat conțin bacterii de contaminare a căror creștere a fost inhibată. De aceea purificarea culturii necesită cel puțin 1—2 repicări pe un mediu diferențial adecvat cu inoculul prelevat numai prin atingerea superficială cu ansa a coloniilor sugestive din primocultură.

5.2.2. Etalarea uniformă a inoculului pe plăci Petri

Este indicată fie pentru cantificarea aproximativă a bacteriilor dintr-o suspensie, fie pentru antibiograma difuzimetrică (vezi 7.4). Se face cu ajutorul etalorului din sticlă sterilizat prin aer cald.

Un mic volum determinat din diluțiile decimale ale suspensiei bacteriene este depus cu pipeta pe placa cu suprafața mediului bine «uscată» și este etalat uniform în direcții succesive până la absorbția completă a inoculului în mediu. După incubarea corespunzătoare (vezi mai jos), se aleg plăcile cu creștere între 30 și 300 colonii (minimizează eroarea) și se calculează numărul unităților formatoare de colonii după formula:

$$X = N \cdot D \cdot \frac{1}{\text{volumul insămânțat}},$$

unde:

X = concentrația U.F.C. din suspensie;

N = numărul coloniilor pe placă;

D = inversul diluției.

Etalarea pe placă, uzual cu tamponul, a unei suspensii bacteriene mai concentrate dă creșterea «în pânză» sau semiconfluentă necesară antibiogramei (vezi 7.4).

5.2.3. Însămânțarea pantei de agar nutritiv

Este indicată pentru păstrarea culturilor pure pe durate limitate, e.g. până la identificarea finală a tulpinilor marțor pentru antibiografe sau pentru testele biochimice. Manipulând aseptice, se încarcă o ansă cu inoculum din cultura purificată, se introduce ansa până deasupra apei de condens a tubului și se retrage descriind pe suprafața pantei striuri strânse în zig-zag, fără a zgâria mediul.

5.2.4. Însămânțarea coloanei de agar nutritiv moale

Uzual se face pentru diferențierea bacteriilor mobile de cele imobile și pentru testarea unor activități biochimice. Manipulând aseptice se încarcă acul de inoculare cu inocul din cultura pură și se face o înțepătură unică de la suprafață până în profunzimea coloanei de agar. După incubarea corespunzătoare se apreciază creșterea și se interpretează mobilitatea (figura 5.2).

5.2.5. Însămânțarea recipientelor cu mediu de cultură lichid

Aceste însămânțări se fac exclusiv din prelevate patologice monobacteriene (e. g. lichid cefalorahidian, exsudate din cavitățile seroase, sânge) și sunt indicate când bacteriile se află în număr prea mic pentru a fi depistate microscopic sau izolate pe medii solide. Se însămânțează, cu pipeta Pasteur sau cu seringă de recoltare, câteva picături până la câțiva ml de produs.

Tuburile cu medii lichide de identificare sunt însămânțate cu ansă.

5.2.6. Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate

Se bazează pe termorezistența sporilor. Produsul microbial suspensionat în soluție salină izotonă este încălzit 10 minute în baia de apă la 80°C, după care este epuizat pe suprafața mediului solid.

5.3. INCUBAREA CULTURILOR

Incubarea constă în menținerea mediilor însămânțate în condițiile necesare dezvoltării culturilor. Majoritatea bacteriilor patogene sunt mezofile, cultivă optim la 37°C și au *creștere rapidă*: cultura apare peste noapte. La bacteriile cu *creștere lentă* cultura poate fi observată abia după câteva zile sau săptămâni de incubare. Temperatura constantă de incubare este asigurată de termostate, incinte termoizolate prevăzute cu sursă de încălzire (electrică) și sistem termoreglator.

Potențialul de oxidoreducere (rH) al mediului de cultură este esențial pentru unele bacterii. Această influență poate fi intuită dacă însămânțăm bacteriile prin omogenizare

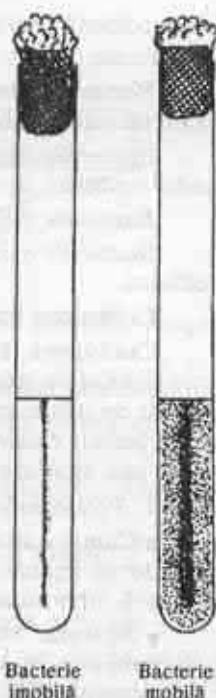


Fig. 5.2. Aprecierea mobilității unei bacterii prin înțepătura coloanei de geloză moale

intr-o coloană înaltă de agar nutritiv în care rH-ul scade semnificativ de la suprafață spre profunzime.

Bacteriile strict aerobe se dezvoltă numai pe suprafața mediului unde au asigurat contactul cu oxigenul.

Bacteriile facultative sunt indiferente la rH, ele se dezvoltă de la suprafață până la fundul coloanei de mediu.

Bacteriile strict anaerobe se dezvoltă numai în profunzimea coloanei de mediu.

Bacteriile microaerofile se dezvoltă numai într-o bandă relativ îngustă sub suprafața mediului.

Cultivarea bacteriilor aerobe și facultative se face în atmosferă normală.

Cultivarea bacteriilor strict anaerobe impune o reducere corespunzătoare a potențialului de oxidoreducere al mediilor și prezervarea culturii de contactul cu oxigenul. Acestea se obțin prin mai multe metode accesibile, în funcție de dotarea laboratorului. Unele permit cultivarea anaerobilor pe plăci cu mediu agarizat, altele numai în tuburi cu bulion sau agar moale.

1. Procedeele fizice:

■ *Camera anaerobă (glove box)* în care operațiunile de la însămânțare la observarea culturilor și repicări se fac în absența oxigenului. O descriere cu amănunte a acestei dotări rezervată laboratoarelor specializate depășește obiectivele manualului.

■ *Sistemul Mac Intosh și Fildes* folosește un borcan etanș din care aerul, îndepărtat cu o pompă de vid, este înlocuit cu hidrogen sau cu un amestec gazos (azot 85%, CO₂ 5%, hidrogen 10%), iar clorura de paladiu inclusă în azbest catalizează la cald (rezistență electrică) fixarea hidrogenului pe urmele de oxigen.

■ *Sistemul Gaspak* folosește un borcan transparent și etanș, în care apa adăugată într-un pachet din foiță de aluminiu, care conține tablete de borohidrat de sodiu, clorură de cobalt, acid citric și bicarbonat de sodiu, degajă H₂, CO₂ și H₂O. Granulele din aluminat de paladiu, fixate la capac, catalizează la rece fixarea completă a O₂ pe H₂ cu formare de H₂O.

2. Procedee chimice:

■ *Medii de cultură cu ingrediente reducătoare* (acid tioglicolic sau tioglicolat de sodiu), ușor agarizate, pentru creșterea vâscozității, și cu un indicator de rH (vezi mai jos) sunt repartizate în tuburi în coloană înaltă (e. g. mediul VF). Când indicatorul de rH apare oxidat pe o înălțime mai mare de 1/4 de la suprafață, mediul trebuie «regenerat» prin fierbere în baie de apă timp de 15 minute, pentru îndepărtarea aerului solvit. După regenerare tuburile sunt răcite brusc în apă, apoi însămânțate.

■ Într-o cutie Petri poate fi creată o incintă etanșă din care oxigenul este îndepărtat prin reacția cu pirogalolul în mediu alcalin (figura 6.3). Un pachetel cu:

Pirogalol	0,4 g
Carbonat de potasiu	0,4 g
Talc	4,0 g

este suficient pentru a crea anaerobioză într-o cutie Petri cu diametrul de 11 cm.

3. Procedee biologice:

■ *Procedeele Tarozzi* utilizează tuburi cu un bulion nutritiv în care rol de agent reducător îl au fragmente din organele proaspete de animal prelevate aseptice (ficat, rinichi). Tuburile sunt însămânțate după verificarea sterilității timp de 24—48 ore la 37°C.

■ Pe o jumătate a unei plăci Petri cu un mediu adecvat se însămânțează dens o bacterie aerobă foarte avidă pentru oxigen, iar pe cealaltă jumătate se epuizează bacteria

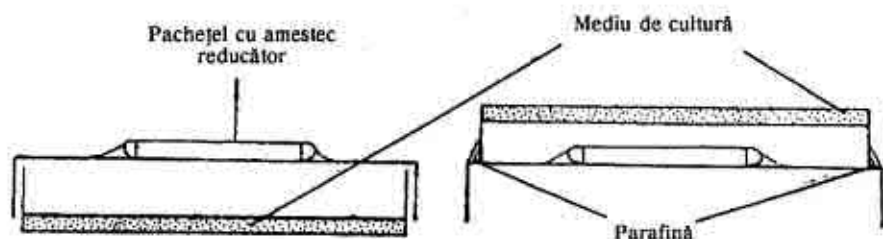


Fig. 5.3. Incinta anaerobă creată cu ajutorul pirogalolului alcalin

anaerobă. Imediat cutia se etanșează prin parafinare. Bacteria aerobă consumă oxigenul și creează condiții pentru creșterea bacteriei anaerobe.

Prezervarea de contactul cu aerul a culturilor în tuburi este realizată prin acoperirea mediului cu un strat de ulei de parafină steril sau prin cultivare în tuburi Weinberg (tuburi de 240/10 mm) cu coloană înaltă de mediu regenerat.

Indicatori pentru anaerobioză. Mai utilizat este indicatorul lui Fildes și Mac Intosh cu albastru de metilen:

- soluție apoasă de glucoză 6% (prezervată cu un mic cristal de timol);
- soluție NaOH 1/10 N; 6 ml în 94 ml apă distilată;
- soluție apoasă de albastru de metilen 0,5% 3 ml în 100 ml apă distilată.

Câte 1 ml din fiecare soluție se amestecă într-o eprubetă și se fierbe până la decolorare, după care se plasează în incinta anaerobă înainte de a o închide etanș. La sfârșitul incubării:

- culoarea albastră indică un rH nesatisfăcător,
- culoarea albă denotă un rH satisfăcător pentru cultivarea anaerobilor.

Cultivarea bacteriilor microaerofile (e. g. specii de *Campylobacter*) se face în termostate speciale sau în pungi etanșe din masă plastică într-un amestec gazos cu O₂ de 5—7%, CO₂ de 8—10% și N₂ de 85%.

Bacteriile carboxofile se cultivă uzual într-un borcan închis ermetic în care este lăsată să ardă o lumânare; când concentrația lui CO₂ atinge 5—10%, lumânarea se stinge.

O concentrație de cca 5% CO₂ poate furniza reacția dintre carbonatul de calciu (bucățele de marmură) și acidul clorhidric, în cantități în funcție de volumul V în litri al excicatorului. Astfel într-un mic vas introdus în excicator se adaugă:

Bucățele de marmură $0,25 \times V$, g

Acid clorhidric 25% $2,50 \times V$, ml.

Pentru concentrații mai mari de CO₂ se mărește corespunzător cantitatea reactivilor.

5.4. STUDIUL CARACTERELOR DE CULTURĂ

Exigențele nutritive, condițiile și intervalul de incubare, ca și aspectul culturilor, orientează identificarea bacteriilor.

Bacteriile cu încărcătură electronegativă puternică și suprafața hidrofilă, proprietăți asigurate de structuri de înveliș, tulbură omogen mediile de cultură lichide, formează suspensii stabile și colonii rotunde, netede, umede, lucioase. Este forma de cultură S (de la engl. *smooth* = neted). Dimpotrivă, cele cu încărcătură electronegativă și hidrofilie mai reduse autoaglutinează, cultivă sub formă de bulgări, lăsând mediul supernatant clar și

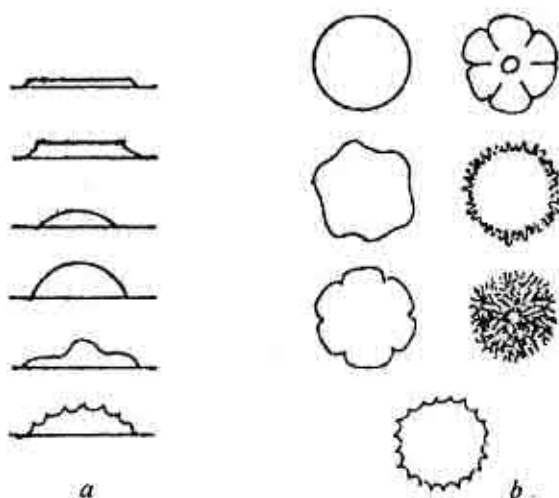


Fig. 5.4. Aspectul coloniilor bacteriene: a — relieful; b — conturul

formează colonii cu margini neregulate, cu suprafața uscată, rugoasă. Este *forma de cultură R* (de la engl. *rough* = rugos).

Condițiile de cultivare și aspectul culturii sunt caractere cheie folosite pentru identificarea bacteriilor. Aspectul coloniilor variază între bacterii fără a permite însă diferențieri de specie categorice. Se urmăresc (figura 5.4):

- **dimensiunea:** colonii mari (2—3 mm diametru), mici (0,1—1 mm diametru) sau mijlocii (1—2 mm diametru);

- **conturul:** circular cu margini întregi, lobat, zimțat, dendritic, în «hartă geografică»;

- **relieful:** plat, bombat, acuminat, papilat;

- **suprafața:** lucioasă sau granulară, umedă sau uscată, rugoasă;

- **culoarea:** nepigmentate sau pigmentate cu sau fără irizații;

- **opacitatea:** opace sau transparente;

- **consistența:** untoasă, mucoasă, friabilă, pieloasă;

- **aderența la mediu:** neaderente sau puternic aderente de suprafața mediului, încastate;

- **hemoliza:** prezența și tipul (pe medii cu sânge).

INTERACȚIUNI NEGATIVE ÎNTRE POPULAȚIILE MICROBIENE

În habitate unde se acumulează densități mari de microorganisme apar interacțiuni negative care limitează una sau alta din populații. Aceste interacțiuni negative sunt:

- competiția pentru un factor limitat de mediu;
- amensalismul;
- antibioza;
- parazitismul și prădarea.

În microbiologia medicală, interacțiunile negative între populațiile microbiene au mai multe implicații privind:

- transportul și conservarea prelevatelor patologice intens contaminate;
- izolarea unor microorganisme patogene din asemenea prelevate;
- terapia antiinfecțioasă;
- identificarea unor markeri epidemiologici;
- echilibrul ecologic și rolul de barieră ecologică al microflorei normale a organismului viu.

6.1. COMPETIȚIA

Competiția este printre cei mai importanți factori selectivi între populațiile microbiene care împart aceleași resurse de mediu: nutrienți (sursă de energie și carbon, azot, fosfor, factori de creștere etc.), spațiu vital, aer etc.

Cel mai simplu și sugestiv exemplu de competiție este aspectul culturii obținute prin epuizarea unui produs microbial pe o placă Petri: coloniile foarte apropiate sunt mici, fiind în competiție pentru nutrienți și spațiu, în timp ce coloniile rare, din ultimele zone de epuizare, sunt mult mai mari.

Lupta bilaterală a competitorilor pentru satisfacerea unor necesități comune se concentrează în esență asupra timpului specific de generație (viteza de creștere) și asupra concentrației substratului disputat.

În asociația *Escherichia coli*—*Staphylococcus aureus* specia care se multiplică mai rapid, *E. coli*, epuizează nutrienții și limitează numărul *S. aureus*. Așa pot fi înțelese rezultatele fals negative la izolarea unor patogeni din prelevate cu floră de asociație care nu sunt examinate imediat sau conservate corespunzător.

În condiții fizico-chimice definite raporturile dintre competitori se pot schimba. Astfel incubarea la 4°C funcționează ca metodă de îmbogățire pentru *Listeria monocytogenes*, care, la această temperatură, se multiplică mai repede decât contaminanții. Uneori însă contaminanții psihrofili (e. g. pseudomonade) pot compromite izolarea unor patogeni din prelevate conservate timp prea îndelungat la frigider. Tot pe principiul competiției, în prezența unui agent inhibitor pentru microorganismele de contaminare, funcționează și diferitele medii de îmbogățire a unor patogeni.

Competiția poate fi interspecifică și intraspecifică.

Competiția interspecifică este interacțiunea dintre două sau mai multe specii diferite. Ea poate explica moartea unei bacterii patogene ajunse în sol sau în apă, chiar și într-un prelevat patologic cu floră abundentă de asociație examinat tardiv și conservat necorespunzător.

Competiția intraspecifică explică *rough*-izarea tulpinilor patogene în subculturi (timpul de generație mai scurt al tulpinilor R față de cele S în condițiile absenței pe mediul de cultură artificial a presiunilor selective din organismul infectat — complement, fagocite etc.); predominanța tulpinilor bacteriene sensibile la un antibiotic în absența antibioticului din mediu.

6.2. AMENSALISMUL

Amensalismul constă în producerea de către microorganismele unei specii de metaboliți organici (acizi grași, etanol, enzime etc.) sau anorganici (peroxid de hidrogen, amoniac etc.) solubili, care influențează negativ creșterea altor microorganisme asociate din mediu.

Amensalismul funcționează ca important factor al barierei ecologice realizate de microflora normală a organismului (vezi capitolul 14). Streptococii viridans din gură și orofaringe produc H₂O₂ prin care inhibă dezvoltarea unor specii patogene catalazonegative (e. g. streptococi piogeni, *Haemophilus* sp. ș.a.). Microflora rezidentă a pielii produce, prin hidroliza sebumului, acizi grași, care previn colonizarea tegumentului cu bacterii patogene.

6.3. ANTIBIOZA

Antibioza are la bază producerea de către anumite microorganisme a unor compuși chimici specifici care în concentrații mici au efect inhibitor sau letal asupra altor microorganisme. Asemenea substanțe antimicrobiene specifice sunt:

■ *Antibioticele*, produse de către unele eubacterii, actinomicete și fungi. Unele au toxicitate selectivă și sunt folosite în terapia antimicrobiană (vezi capitolul 7). Mai rar anumiți determinanți de rezistență ai bacteriilor la antibiotice sunt folosiți ca markeri epidemiologici (antibiovarul).

■ *Bacteriocinele*, substanțe bactericide, difuzibile, codificate plasmidic și produse de către tulpini bacteriene. Sunt imunogene și au un spectru antimicrobian foarte selectiv, motiv pentru care nu au putut fi folosite în terapia antimicrobiană. Sunt probabil un element

important al echilibrului ecologic în mediile habitate de bacterii și pot fi folosite ca markeri epidemiologici (vezi 8.2).

6.4. PARAZITISMUL ȘI PRĂDAREA

Dintre aceste interacțiuni negative, pentru microbiologia medicală mai important este parazitismul prin virusuri, bacteriofagi, micofagi, care în afara semnificației biologice deosebite (rolul în echilibrul ecologic, în variabilitatea genetică a bacteriilor) și-a găsit aplicații practice bine definite ca markeri epidemiologici, vectori de gene în ingineria genetică etc. (vezi 8.1).

Fenomenele de prădare influențează mai mult soarta unor bacterii patogene în mediul extern. Mixobacteriile lizează și se dezvoltă mai bine pe seama unor bacterii vii decât pe bacterii moarte. Experimente în acest sens au fost făcute și cu bacterii din microflora organismului nostru (e. g. *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*).

ROLUL LABORATORULUI ÎN ÎNȚIEREA ȘI MONITORIZAREA TERAPIEI ANTIMICROBIENE

Opțiunea, orientarea și controlul terapiei antimicrobiene sunt decizii bazate pe trepidul format de:

- raționamentul clinic;
- cunoașterea farmacologiei chimioterapicelor și antibioticelor;
- rezultatul testelor de laborator.

Ținerea terapiei antimicrobiene este singura decizie medicală care necesită cunoașterea farmacologiei unui medicament concomitent față de 2 specii: bolnavul și microbul.

7.1. RELAȚIILE MICROB—MEDICAMENT ANTIMICROBIAN. DEFINIREA CATEGORIILOR DE SENSIBILITATE

Relația *in vitro* este definită prin *concentrația minimă inhibitoare* (CMI): cantitatea cea mai mică de medicament antimicrobian care inhibă creșterea tulpinii testate. *Concentrația minimă bactericidă* (CMB) este cantitatea cea mai mică de antibiotic care omoară 100—99,9% din indivizii tulpinii testate.

Definirea relației *in vitro* implică un factor nou: *concentrația de medicament activ antimicrobian în focarul de infecție*. Cu alte cuvinte: în focarul de infecție se realizează sau nu se realizează CMI?

Pentru necesități terapeutice curente, într-o viziune simplificată, definim o tulpină microbiană în raport cu un medicament antimicrobian:

■ *Sensibilă*, când CMI este de minimum 2—4 ori mai mică decât nivelul medicamentului în serul sangvin în condițiile unor doze unice sau repetate normale. Efectul terapeutic este posibil.

■ *Rezistentă*, dacă CMI este mai mare decât nivelul seric al medicamentului. Efectul terapeutic este neverosimil, medicamentul fiind toxic pentru pacient înainte de a fi pentru microb.

■ *Intermediar sau moderat sensibilă*, dacă CMI este apropiată de nivelul seric al medicamentului. Efectul terapeutic este nul sau imprevizibil, cu excepția situațiilor în care

se pot administra doze foarte mari (e. g. administrare locală) sau medicamentul se concentrează în focarul de infecție (e. g. urină).

7.2. TINTIREA ETAPIZATĂ A TERAPIEI ANTIMICROBIENE

Sunt de considerat trei etape:

1. *Microbul infectant a fost stabilit cu probabilitate prin raționamentul clinico-epidemiologic.*

Puține sindroame sunt monoetiologice și determinate de bacterii care și-au păstrat sensibilitatea naturală la antibioticul de elecțiune (e. g. scarlatina, erizipelul, determinate de *Streptococcus pyogenes*, care a rămas foarte sensibil la penicilină). Cele mai multe bacterii au dobândit rezistență la antibiotice, modificându-și spectrul de sensibilitate la antibioticele uzuale.

În aceste situații:

- dacă terapia antimicrobiană este urgentă, se ia precauția elementară de a o începe numai după prelevarea probelor necesare pentru izolarea agentului etiologic;
- antibioticul(ele) pentru terapie se alege în raport cu spectrul actual de sensibilitate al agenților etiologici probabili. Dacă aceștia au dobândit cu frecvență semnificativă rezistență la antibioticele uzuale, sunt indicate antibiotice de rezervă.

Antibiotic de rezervă: medicament cu utilizare acceptat restrânsă la tratarea infecțiilor grave până la aflarea rezultatului antibiogramei (vezi mai jos) sau și după aceasta, când tulpina infectantă este rezistentă la antibioticele uzuale. Din nefericire, în lipsa consensului asupra acestui regim restrictiv, în rezervă sunt trecute fie ultimele antibiotice intrate în uz (cele mai scumpe), fie cele prea toxice pentru a fi utilizate curent.

Spectrul de sensibilitate la antibiotice al unei specii bacteriene este suma antibioticelor față de care sunt sensibile majoritatea sau toate tulpinile dintr-un eșantion reprezentativ testat. În timp, sub presiunea selectivă a antibioticelor utilizate într-un teritoriu, procentul tulpinilor cu rezistență dobândită crește. De aceea spectrul de sensibilitate al bacteriilor la antibiotice trebuie diferențiat în *spectru inițial* sau *natural* și *spectru actual*, care este mai restrâns decât cel natural și variază în timp de la colectivitate la colectivitate (mai restrâns în colectivități de spital decât în colectivitatea generală).

Laboratorul comunică periodic clinicienilor evoluția rezistenței între tulpinile unei specii sub forma unor valori deduse din curbele distribuției cumulative ale CMI sau altor modalități grafice. Aceste valori sunt CMI procentuale, care precizează concentrația minimă inhibitoare a unui antibiotic pentru 10; 25; 50; 75; 90 sau 100% din tulpinile testate (CMI₁₀, CMI₂₅, CMI₅₀ ș. a.).

2. *Microbul infectant a fost depistat prin tehnici rapide microscopice sau antigenice.* Apelăm tot la spectrul actual de sensibilitate, dar sfera probabilităților se restrânge la speciile aparținând unei singure categorii microscopice sau chiar la o singură specie.

3. *Microbul infectant a fost izolat în cultură pură.* Antibiograma indică *spectrul real de sensibilitate* la antibiotice a tulpinii infectante. Testarea producerii de β -lactamază de către izolatele cu semnificație clinică din cultura primară este indicată când antibioticul de elecțiune poate fi o penicilină.

Antibiograma se face cultivând microorganismul testat în condiții standard (mediu de cultură, inoculum, incubare etc.) în prezența unui gradient de medicament antimicrobian. Gama medicamentelor pentru testare este selectată în funcție de microorganism și localizarea infecției (tabelul 7.1).

Tabelu 7.1. Selectarea agenților antimicrobieni pentru antibiogramă

Agenți antimicrobieni reprezentativi pentru grup	Streptococi	Stafilococi	Bacili gramnegativi		Bacili gram- pozitivi
			din urină	alții	
<i>β-Lactamine</i>					
Ampicilină	X ¹		X	X	X
Carbencilină			X	X	
Oxacilină/Meticilină		X			
Penicilină G	X	X			X
Cefalotină ²		X ³	X	X	X
Imipenem ⁴	X ^{1,3}	X		X	
Aztreonam ⁴				X	
<i>β-Lactamine + inhibitori de β-lactamaze</i>					
Amoxicilină + + clavulanat		X ⁶	X	X ⁷	
Ticarcilină + + clavulanat		X	X	X ⁷	
<i>Glicopeptide</i>					
Vancomicină ⁴	X ^{1,5}	X			X
<i>Aminoglicozide</i>					
Amikacină			X	X	
Gentamicină	X ⁸	X ⁸	X	X	
Kanamicină		X	X	X	
<i>Macrolide</i>					
Eritromicină	X	X			X
<i>Chinolone</i>					
Acid nalidixic			X		
Norfloxacină	X ¹	X	X	X	
Ofloxacină	X ¹	X	X	X	
<i>Altele</i>					
Cloramfenicol ⁹	X	X		X	
Clindamicină		X ¹⁰			X
Nitrofurantoină			X		
Polimixină B			X		
Tetraciclina ¹¹			X	X	

Agenți antimicrobieni reprezentativi pentru grup	Streptococi	Stafilococi	Bacili gramnegativi		Bacili gram-positivi
			din urină	alții	
Trimetoprim + sulfametoxazol			X	X ¹²	

¹ Testare numai pentru streptococii grup D.

² În caz de rezistență, izolatele se vor testa față de o cefalosporină din generația a II-a (e. g. cefoxitină și cefamandol) sau a III-a (e. g. cefotaximă). Dacă testările au fost făcute concomitent, iar tulpina este sensibilă la cefalosporina din generația I se comunică numai această sensibilitate

³ Nu se comunică rezultatul, dacă tulpina de stafilococ este rezistentă la oxacilină (CMI ≥ 4 μg/ml).

⁴ Se comunică rezultatul numai în caz de rezistență la antibioticele uzuale (e. g. tulpini de spital).

⁵ Numai pentru enterococi și în administrare asociată cu un aminoglicozid (e. g. endocardite subacute cu enterococi rezistenți la alte antibiotice).

⁶ Nu se comunică pentru *Staphylococcus epidermidis* rezistent la meticilină (CMI ≥ 16 μg/ml).

⁷ Nu este activă asupra *Enterobacter* sp., *Morganella morgani*, *Serratia marcescens* și *Pseudomonas aeruginosa*, ale căror β-lactamaze sunt rezistente la clavulanat.

⁸ Se testează și se comunică rezultatele numai pentru izolatele din ochi.

⁹ Se comunică numai pentru izolatele din hemoculturi, lichidul cefalorahidian, ochi și coproculturi.

¹⁰ Pentru stafilococi CMI a clindamicinei este mai mică sau egală cu 4 μg/ml, nu se comunică dacă CMI a eritromicinei este mai mare de 4 μg/ml.

¹¹ Nu se testează față de *Proteus*.

¹² Se comunică numai pentru tulpinile de *Shigella* din coprocultură.

După modalitățile de realizare a gradientului de concentrații ale antibioticelor față de care testăm bacteria deosebim: metoda diluțiilor și metoda difuzimetrică.

7.3. ANTIBIOGRAMA CANTITATIVĂ: METODA DILUȚIILOR

Principiu: inoculul standardizat al tulpinii testate se însămânțează într-un gradient discontinuu de concentrații ale medicamentului antimicrobian realizat fie în plăci cu mediu agarizat, fie în tuburi cu bulion nutritiv. După incubare adecvată se urmărește CMI.

Indicații:

- În infecții care amenință viața bolnavului, determinarea gradului de sensibilitate a tulpinii infectante ameliorează decizia terapeutică (doză, cale de administrare).
- Precizarea sensibilității unei tulpini clasificate intermediare (sensibilitate nedeterminată) față de un antibiotic prin testul de difuzie.
- Confirmarea rezistenței la aminoglicozide determinată prin testul de difuzie.
- Determinarea sensibilității microorganismelor cu creștere lentă.
- Testarea prin diluții în plăci cu agar nutritiv este tehnica de elecție pentru laboratoarele mari (testarea a mai mult de 10 tulpini pe zi) și pentru supravegherea evoluției rezistenței bacteriilor la antibiotice.
- Testarea prin diluții în tuburi cu bulion nutritiv este un timp premergător pentru

determinarea CMB.

Amănunțele privind materialele necesare și procedura, strict standardizate, depășesc obiectivul acestui manual. Necesitățile clinice sunt satisfăcute prin testarea față de 3—4 diluții care acoperă gama de concentrații serice sau din focarul infecțios (meningian, urinar ș. a.) realizate curent cu diferite antibiotice. Tulpinile martor se testează față de CMI cunoscută plus/minus o diluție. Diluțiile se efectuează în tuburi cu bulion Mueller-Hinton (figura 7.1) sau plăci cu agar Mueller-Hinton. În tabelul 7.2 este prezentată cheia pentru interpretarea CMI în raport cu un standard care definește în prezent sensibilitatea și rezistența.

Tabelul 7.2. Cheia de interpretare a valorilor CMI ale reprezentanților pentru diferitele grupe de agenți antimicrobieni (conform datelor BSAC, 1991 și Standardului M7/1990 al NCCLS)

Agent antimicrobian	Concentrație serică maximă, $\mu\text{g/ml}$	Valoarea CMI, $\mu\text{g/ml}$	
		rezistent \geq	sensibil \leq
<i>β-Lactamine</i>			
Ampicilină/Amoxicilină	30		
■ bacili gramnegativi enterici		32	8
■ enterococi		16	—
■ <i>Listeria monocytogenes</i>		4	2
■ <i>Haemophilus influenzae</i>		4	1
Carbencilină	100		
■ <i>Pseudomonas</i>		512	128
■ alți bacili gramnegativi		64	16
Meticilină	10	16	8
Oxacilină	6	4	2
Penicilină G	12		
■ stafilococi		<i>β-Lactamază</i>	0,1
■ enterococi		16	—
■ streptococi (nonenterococi)		4	0,12
■ <i>L. monocytogenes</i>		4	2
■ gonococi		2	0,06
Cefalotin	15	32	8
Imipenem	60	16	4
Aztreonam	40	32	8
Amoxicilină + clavulanat	30		
■ stafilococi		8/4	4/2
■ alte microorganisme		16/8	8/4
Ticarcilină + clavulanat	100		

Tabelul 7.2 (continuare)

Agent antimicrobian	Concentrație serică maximă, $\mu\text{g/ml}$	Valoarea CMI, $\mu\text{g/ml}$	
		rezistent \geq	sensibil \leq
■ <i>Pseudomonas</i>		128/2	64/2
■ alte microorganisme gram-negative		128/2	16/2
<i>Glicopeptide</i>			
Vancomicină	25	32	4
<i>Aminoglicozide</i>			
Amikacină	20	32	16
Gentamicină	4	8	4
Kanamycină	20	25	6
<i>Macrolide</i>			
Eritromicină	2	8	0,5
<i>Chinolone</i>			
Acid nalidixic	25 ¹	32	8
Norfloxacină	1,5	16	4
Ofloxacină	7,5	8	2
■ gonococi		—	0,25
<i>Altele</i>			
Cloramfenicol	10	32	8
■ <i>Haemophilus influenzae</i>		8	2
Clindamicină	4	4	0,5
Nitrofurantoină	3 ¹	128	32
Polimixină E (colistin)	5	4	0,5
Tetraciclină	3	16	4
■ <i>Haemophilus influenzae</i>		8	2
■ gonococi		2	0,25
Trimetoprim + sulfamotiazol	2/50	8/152	2/38

¹ Aceste medicamente sunt indicate numai pentru infecții ale căilor urinare. Concentrațiile urinare pe care le realizează sunt: acidul nalidixic 500 $\mu\text{g/ml}$, iar nitrofurantoina 200 $\mu\text{g/ml}$.

Determinarea CMB este indicată pentru izolatele din septicemii și endocardite subacute. Dacă se numără comparativ bacteriile viabile din inoculum și din tuburile fără creștere evidentă la determinarea CMI, poate fi calculată CMB conform definiției și figurii 7.1.

7.4. ANTIBIOGRAMA DIFUZIMETRICĂ

Principiu: O cantitate de medicament antimicrobian este depusă pe suprafața mediului de cultură agarizat preînsămânțată cu bacteria testată. Două fenomene se produc concomitent în cursul incubației culturii: difuziunea antimicrobianului și creșterea bacteriei. În aria unde antimicrobianul în difuziune realizează concentrații cel puțin egale cu CMI, bacteria nu crește. O dată cu intrarea culturii în faza exponențială, *momentul critic*, bacteria se divide mai repede decât difuzează antimicrobianul și se acumulează o pănză vizibilă de cultură neinfluențată de modificări ulterioare ale concentrațiilor antimicrobiene. Circumferința zonei de inhibiție se stabilește în primele ore de incubație ca loc geometric al punctelor unde antimicrobianul a atins CMI în momentul critic al culturii (faza de lag plus primele 2—3 generații). Astfel diametrul zonei de inhibiție variază invers proporțional cu CMI.

Indicații: Testarea organismelor cu creștere rapidă (creștere peste noapte la 35—37°C): enterobacteriacee, pseudomonade — sau organisme înrudite — stafilococi, streptococi, specii de *Haemophilus* și *Neisseria*. Metoda este uzuală pentru laboratoarele mici. Dar corelația cu CMI reală este de numai 70—90%, cea mai redusă corelație fiind observată cu antibioticele aminoglicozide.

Probă: colonii din cultura pură a organismului de testat în creștere activă.

Reactivi și materiale:

1. Plăci cu geloză Mueller-Hinton proaspăt turnate în strat uniform de 45 mm grosime.
2. Tuburi cu 2—4 ml bulion nutritiv.
3. Cultura tulpinii de testat și a tulpinii martor.
4. Etalonul nr. 0,5 din scara Mac Farland cu sulfat de bariu.
5. Tamponane din vată pe tijă de lemn.
6. Trusă cu discuri antimicrobiene.
7. Pensă oftalmologică sau repartizor automat de discuri.
8. Șubler.

Procedura (figura 7.2):

1. Se însămânțează în câte un tub cu bulion nutritiv inoculum prelevat cu anșa din 4—5 colonii ale bacteriei testate și, separat, ale tulpinii martor. Se incubează la 37°C până cultura ajunge la turbiditatea corespunzătoare etalonului 0,5 Mac Farland (uzual 3—5 ore). Din momentul etalonării culturii, plăcile trebuie însămânțate în maximum 15 minute.

Pe durata incubării inoculului:

2. Se scot din frigider ambalajele cu discuri antimicrobiene și se mențin închise etanș, 1—2 ore la temperatura camerei pentru echilibrare termică. Astfel se evită condensarea apei pe discurile reci.

3. Se usucă suprafața gelozei Mueller-Hinton, menținând plăcile 20—30 minute, cu capacul întredeschis, la 37°C.

4. Însămânțarea plăcilor: se iversează tamponul de vată în inoculum etalonat. Se scurge excesul de lichid prin rotire fermă a tamponului pe peretele tubului. Se descarcă tamponul în striuri paralele, peste toată suprafața mediului, succesiv în 3 direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60°. În final se parcurge cu vârful tamponului toată circumferința mediului la limita cu sticla.

5. Se lasă placa însămânțată timp de 3—5 minute (nu mai mult de 15), pentru absorbția inoculului.

6. Se depun discurile cu antibiotic la distanța de minimum 15 mm de marginea plăcii

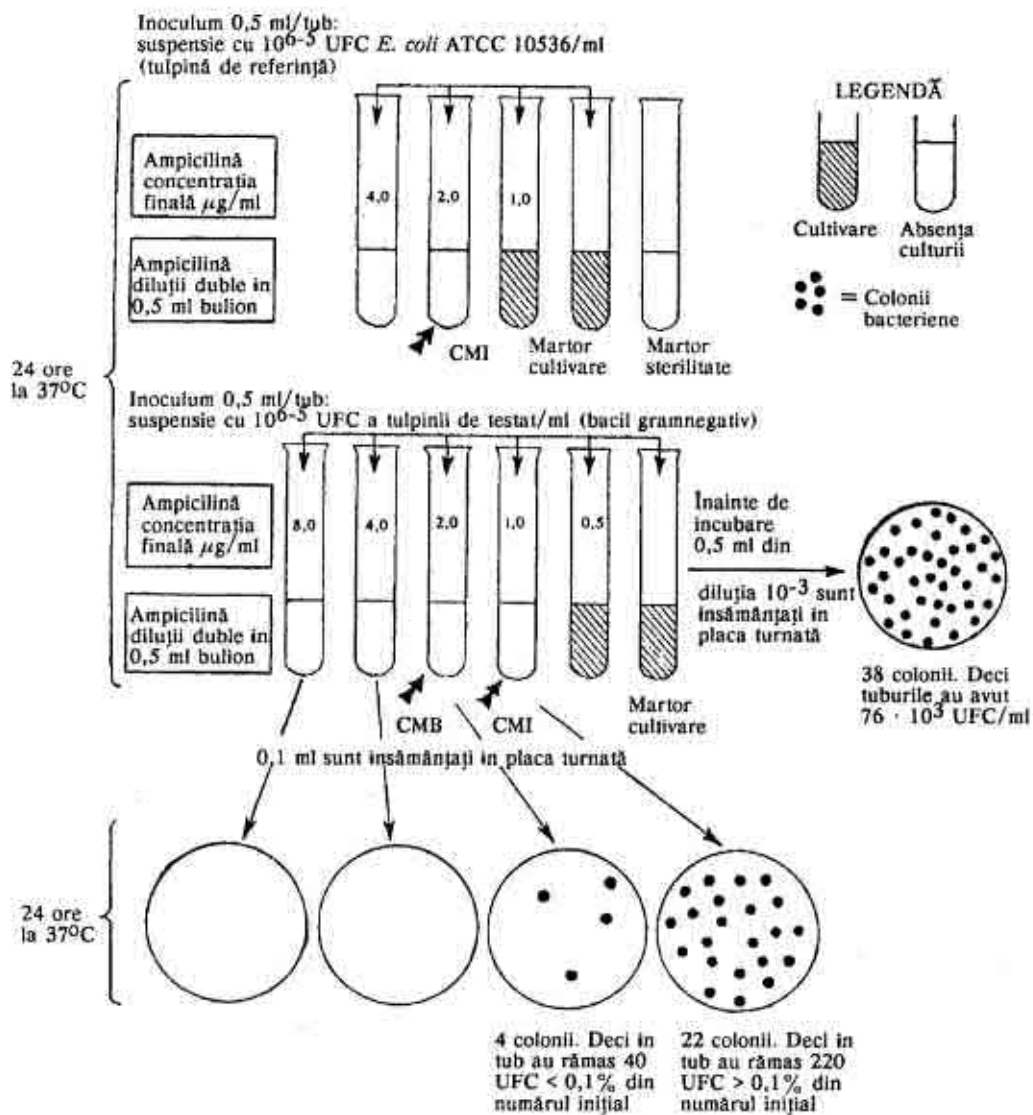
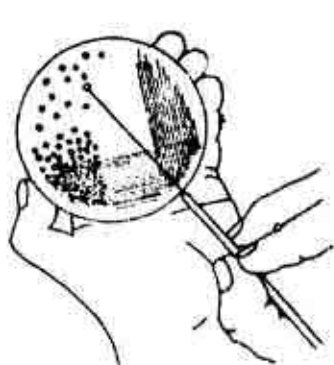
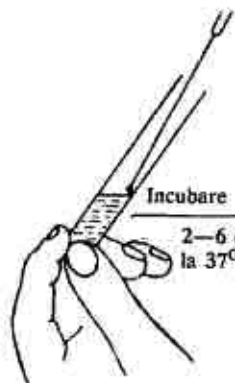


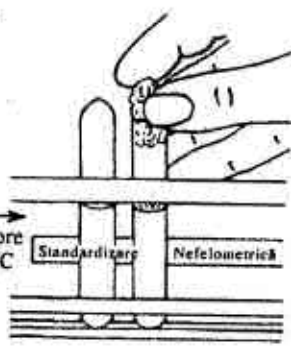
Fig. 7.1. Determinarea CMI și CMB prin diluții în bulion nutritiv



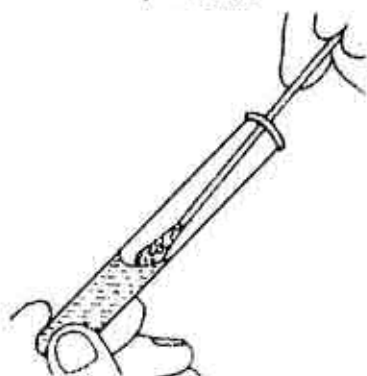
Se prelevă porțiuni din 5—10 colonii ale tulpinii testate



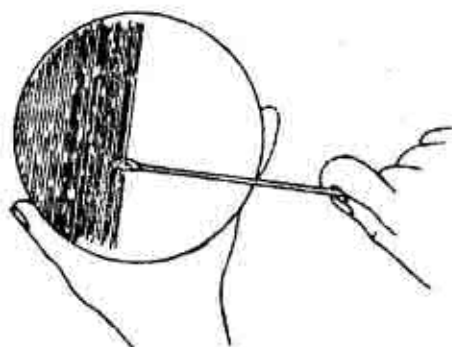
Se suspensează în bulion



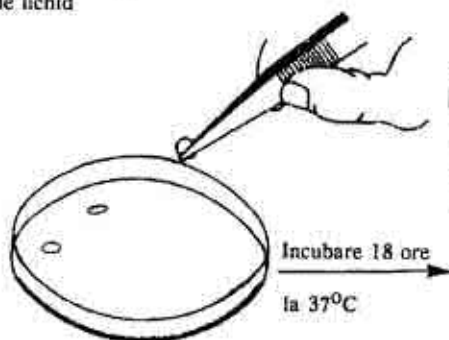
Se compară cu etalonul 0,5 Mac Farland



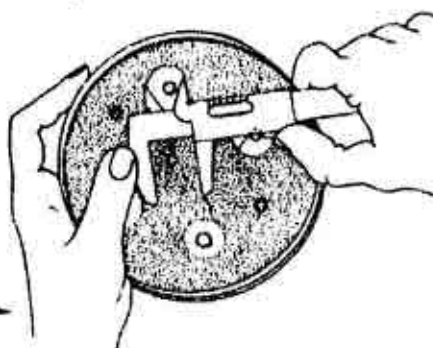
Se prelevă inoculum și se presează tamponul pe peretele tubului pentru a scurge excesul de lichid



Se însămânțează pe o placă cu agar nutritiv



Se depun rondelile cu antibiotic



Se măsoară comparativ diametrul zonelor de inhibiție la tulpina testată și la cea martor

Fig. 7.2. Efectuarea antibiogramii difuzimetrice

și 20—30 mm între ele. Se presează ferm cu pensa fiecare disc pe suprafața mediului.

7. Se incubează imediat plăcile la 37°C pentru 16—18 ore în teancuri de cel mult 2—3 plăci.

Citirea și interpretarea: Se măsoară cu șublerul sau rigla gradată în mm diametrul zonelor de inhibiție completă a creșterii.

Se clasifică bacteria testată în categorii de sensibilitate: sensibilă, intermediară sau rezistentă, prin raportarea diametrelor de inhibiție la tabelul interpretativ standard (tabelul 7.3).

Tabelul 7.3. Standardul NCCLS M2-A4/1990 pentru interpretarea antibiogramei difuzimetrice și diametrele zonelor de inhibiție ale tulpinilor de referință

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm					
		rezistent ≤	intermediar	sensibil ≥	control: tulpini ATCC		
					<i>S. aureus</i> 25923 rangul	<i>E. coli</i> 25922 rangul	<i>P. aerugi- nosa</i> 27853 rangul
<i>β</i> -Lactamine							
Ampicilină	10				24—35	15—20	
■ bacili gram-negativi enterici		13	14—16	17			
■ enterococi		16	17	—			
■ streptococi (nonenterococi)		21	22—29	30			
■ <i>Listeria monocytogenes</i>		19	—	20			
■ <i>Haemophilus influenzae</i>		21	22—24	25			
Carbencilină	100					24—29 20—24	
■ <i>Pseudomonas</i>		13	14—16	17			
■ alți bacili gram-negativi		19	20—22	23			
Meticilină	5	9	10—13	14	17—22		
Oxacilină	1				17—22		

Tabelul 7.3 (continuare)

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm					
		rezistent \leq	intermediar	sensibil \geq	control: tulpini ATCC		
					<i>S. aureus</i> 25923 rangul	<i>E. coli</i> 25922 rangul	<i>P. aerugi- nosa</i> 27853 rangul
■ stafilococi		10	11—12	13			
■ pneumococi pentru controlul sensibilității la penicilină G		19	—	20			
Penicilină G	10 ¹				26—37		
■ stafilococi		28	—	29			
■ enterococi		14	15	—			
■ streptococi (nonenterococi)		19	20—27	28			
■ <i>L. monocytogenes</i>		19	—	20			
■ gonococi		26	—	27—46			
Cefalotină	30	14	15—17	18	25—37	18—23	
Cefamandol	30				28—34	24—31	
■ <i>H. influenzae</i>		20	21—23	24			
■ alte bacterii		14	15—17	18			
Cefoxitină	30				25—28	23—28	
■ gonococi		23	24—27	28			
■ alte bacterii		14	15—17	18			
Cefotaximă	30						
■ <i>H. influenzae</i>		—	—	26			

Tabelul 7.3 (continuare)

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm					
		rezistent ≤	intermediar	sensibil ≥	control: tulpini ATCC		
					<i>S. aureus</i> 25923 rangul	<i>E. coli</i> 25922 rangul	<i>P. aerugi- nosa</i> 27853 rangul
■ gonococi		—	—	31			
■ alte bacterii		14	15—22	23			
Imipenem	10						
■ <i>H. influenzae</i>		—	—	16			
■ alte bacterii		13	14—15	16			
Aztreonam	30						
■ <i>H. influenzae</i>		—	—	26			
■ alte bacterii		15	16—21	22			
<i>β</i> -Lactamine + inhibitori de <i>β</i> -lactamaze							
Amoxicilină + + clavulanat	20/10						
■ stafilococi și <i>H. influenzae</i>		19	—	20			
■ alte bacterii		13	14—17	18			
Ampicilină + sulbac- tam	10/10						
■ enterobacterii gramnegative și stafilococi		11	12—14	15			
■ <i>H. influenzae</i>		19	—	20			
Ticarcilină + + clavulanat	75/10						
■ <i>Pseudomonas</i>		14	—	15			

Tabelul 7.3 (continuare)

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm					
		rezistent \leq	intermediar	sensibil \geq	control: tulpini ATCC		
					<i>S. aureus</i> 25923 rangul	<i>E. coli</i> 25922 rangul	<i>P. aerugi- nosa</i> 27853 rangul
■ alte bacterii gramnegative		14	15–19	20			
<i>Glicopeptide</i>							
Vancomicină	30				15–19		
■ enterococi		14	15–16	17			
■ alte bacterii grampozitive		9	10–11	12			
<i>Aminoglicozide</i>							
Amikacină	30	14	15–16	17	18–26	18–24	15–22
Gentamicină	10	12	13–14	15	19–27	19–26	16–21
Kanamycină	30	13	14–17	18	19–26	17–25	
<i>Macrolide</i>							
Eritromicină	15	13	14–22	23	22–30	8–14	
<i>Ghinolone</i>							
Acid nalidixic	10	13	14–18	19		23–28	
Norfloxacină	10	12	13–16	17			
Ofloxacină	5						
■ <i>H. influenzae</i>		—	—	16			
■ gonococi		—	—	31			
■ alte bacterii		12	13–15	16			
<i>Altele</i>							

Tabelul 7.3 (continuare)

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm					
		rezistent \leq	intermediar	sensibil \geq	control: tulpini ATCC		
					<i>S. aureus</i> 25923 rangul	<i>E. coli</i> 25922 rangul	<i>P. aeruginosa</i> 27853 rangul
Cloramfenicol	30				19—26	21—27	
■ <i>H. influenzae</i>		25	26—28	29			
■ alte bacterii		12	13—17	18			
Clindamicină	2	14	15—20	21			
Nitrofurantoină	300	14	15—16	17	20—24	21—26	
Polimixină B	30	9	10—11	12		12—16	11—16
Tetraciclină	30				19—28	18—25	
■ <i>H. influenzae</i>		25	26—28	29			
■ gonococi		30	31—37	38			
■ alte bacterii		14	15—18	19			
Trimetoprim + sulfametoxazol	1,25/23,75				24—32	24—32	
■ <i>H. influenzae</i> și alte bacterii		10	11—15	16			

¹ Conținutul per rondelă exprimat în UI.

Martori pentru controlul de calitate. Se testează pe placă separată, în aceleași condiții, tulpina de referință adecvată. Recomandăm tulpinile ATCC:

- *Escherichia coli* 25 922 la testarea bacteriilor gramnegative.
- *Staphylococcus aureus* 25 923 la testarea cocilor grampozitivi.
- *Pseudomonas aeruginosa* 27 853 la testarea pseudomonadelor.

Se verifică dacă diametrele de inhibiție ale fiecărui antimicrobian se cuprind în limitele de variație admise (tabelul 7.3).

7.5. DEPISTAREA β -LACTAMAZELOR

Depistarea β -lactamazelor poate fi făcută în orice laborator de microbiologie prin testul cu iod.

Indicații: Testarea rapidă, chiar în primocultură, a sensibilității unei bacterii la peniciline.

Principiu: Amidonul și iodul reacționează în soluție și dau culoarea albastră. Acidul peniciloic, format din penicilină sub acțiunea β -lactamazei, reacționează cu iodul și îl face indispensabil pentru reacția cu amidonul. Prezența β -lactamazei este indicată prin decolorarea complexului iod-amidon.

Reactivi: a) Se dizolvă 1,5 g iodură de potasiu și 0,3 g iod în 100 ml tampon fosfat cu pH 6,4 și 0,1 M. b) Se adaugă 1 ml apă sterilă la un flacon cu 10^6 UI penicilină. Soluția se păstrează congelată în fracțiuni de 0,15 ml/tub de 10/100 mm. c) Soluție 0,4% amidon se sterilizează la autoclav.

Pentru reacție se decongelează un tub cu soluție de penicilină la care se adaugă 1,1 ml soluție de iod.

Procedura: Pe o lamă de microscop se depune o picătură din soluția de penicilină + iod, în care se suspensionează dens, cu anșa, organismul testat. Se adaugă o picătură din soluția 0,4% amidon. Decolorarea suspensiei sau apariția unor arii incolore în jurul agregatelor bacteriene în interval de 5 minute indică un test pozitiv.

Interpretare: Bacteriile producătoare de β -lactamază sunt rezistente la penicilinele inactivate de enzimă, cele neproducătoare pot fi sensibile.

7.6. TESTE DE LABORATOR PENTRU MONITORIZAREA TERAPIEI ANTIMICROBIENE

7.6.1. Determinarea nivelului de eficiență inhibitorie (NEI) a umorilor

Principiu: Se determină cea mai mare diluție de ser (lichid cefalorahidian etc.) care inhibă tulpina infectantă recent izolată de la bolnav.

Indicații: Monitorizarea antibioticoterapiei la pacienți cu endocardite subacute, septicemii, meningite bacteriene.

Prelevarea *probelor* se face aseptice. Proba martor se prelevă înainte primei doze de antibiotic. După 24 ore, interval în care aportul și excreția de antibiotic se echilibrează, se prelevă proba pentru determinarea NEI: imediat înainte administrării unei noi doze (NEI minim); după 30 minute de la administrarea orală sau intramusculară, 5–10 minute după administrarea intravenoasă (NEI maxim) sau la jumătatea intervalului dintre 2 administrări ale antibioticului (NEI mediu).

Cantitățile necesare, 10 ml sânge, 1–2 ml lichid cefalorahidian, se expediază imediat la laborator, unde serul este separat de cheag și se procedează la testare.

Procedura: Testarea NEI este prezentată schematic în figura 7.3.

Interpretarea rezultatelor. Se consideră că un NEI seric mediu de cel puțin 1:8 reflectă eficiența antibioticoterapiei.

Inoculum 0,05 ml/tub
din diluția 10^{-3} a culturii de 18 ore a tulpinii infectate

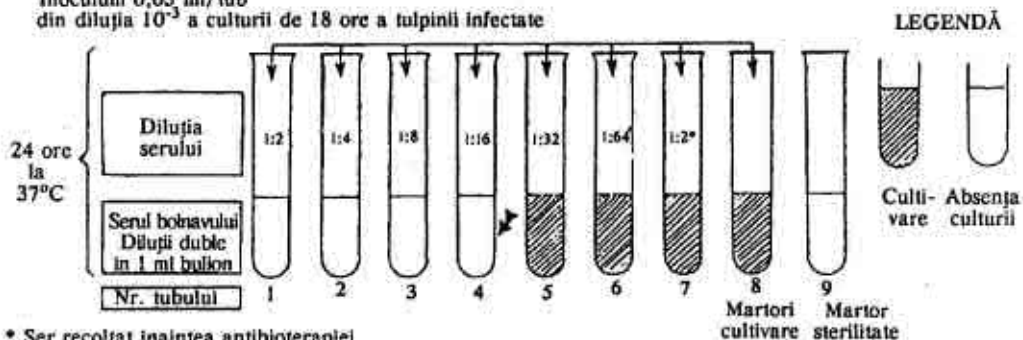


Fig. 7.3. Determinarea nivelului de eficiență inhibitorie a serului în cursul antibioticoterapiei. În exemplul din figură, NEI = 16

7.6.2. Dozarea antibioticelor în umori

Indicații:

- când se administrează antibiotice potențial toxice;
- când se tratează pacienți cu deficiențe metabolice și excretorii (hepatice, renale);
- când se administrează un antibiotic nou sau pe o cale nouă.

Principiu. Se determină concomitent, în condiții identice, răspunsul unei tulpini de referință, foarte sensibile, față de un gradient de concentrații ale antibioticului administrat și față de diluții ale probelor prelevate după administrarea antibioticului.

Prelevarea probelor se face aseptice. O primă probă se prelevă înaintea antibioticoterapiei. Următoarele probe se prelevă după 24 ore de antibioticoterapie în momentul concentrației maxime și minime a antibioticului. Probele se expediază imediat la laborator.

Proceduri:

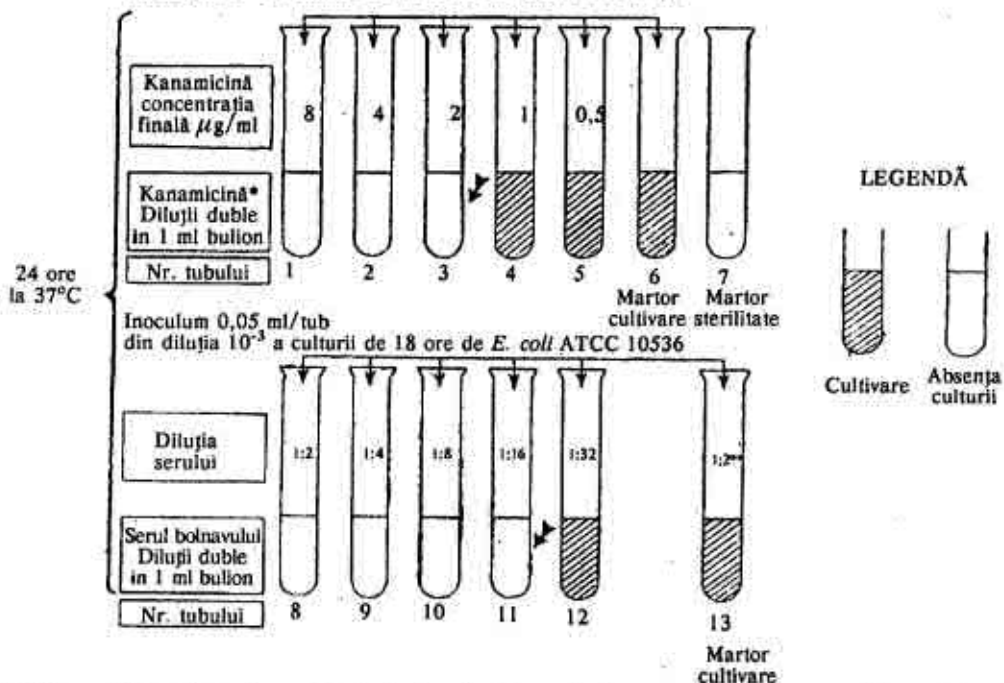
■ **Metoda diluției duble în tuburi** realizează un gradient discontinuu de concentrații ale antibioticului cu limite ale erorii de $\pm 1 \log_2$ (figura 7.4).

■ **Metoda difuzimetrică** oferă un gradient continuu de concentrații ale diluțiilor când se dozează antibiotice la care diferența dintre concentrația terapeutică și cea toxică este mică (ca gentamicina cu concentrația terapeutică de $4 \mu\text{g/ml}$ și cea toxică de $12 \mu\text{g/ml}$). Permite dozări și în umori contaminate.

7.6.3. Metode rapide

Dozarea antibioticelor în umori sau determinarea NEI sunt metode care necesită un interval minimum de 48 ore, iar pentru determinarea NEI este indispensabilă izolarea tulpinii infectante. În monitorizarea terapiei infecțiilor bacteriene grave apare interesul pentru metode mai rapide de urmărire a eficienței tratamentului antimicrobian. Dozarea în dinamică a *proteinei C reactive* (PCR) satisface necesitățile clinice conform argumentelor prezentate în tabelul 7.4.

Inoculum 0,05 ml/tub
din diluția 10^{-3} a culturii de 18 ore de *E. coli* ATCC 10536



- * Soluția conținând $16 \mu\text{g}$ kanamicină în 1 ml realizată în proba de ser recoltată înaintea antibioterapiei
- ** Ser recoltat înaintea antibioterapiei

Fig. 7.4. Dozarea kanamicinei în ser. CMI a kanamicinei pentru tulpina de referință *E. coli* ATCC 10 536 – $2 \mu\text{g/ml}$. Cea mai mică diluție de ser care inhibă tulpina de referință este de 1:6; deci în diluția 1:16 a serului kanamicina a realizat CMI pentru tulpina de referință. Așadar, în serul testat kanamicina a realizat concentrația de $16 \times 2 \mu\text{g/ml}$ – $32 \mu\text{g/ml}$

Tabloul 7.4. Proteina C reactivă în monitorizarea antibioterapiei și prognosticul infecțiilor bacteriene (după M. B. Pepis, 1987)

Nivelele serice normale ale PCR sunt cuprinse între 0,07 și 10 mg/l

Rangul creșterii concentrațiilor serice ale PCR în infecțiile bacteriene grave este între 300 și 1000%

Antibiototerapie eficientă

- Scăderea concentrației PCR cu o perioadă de înjumătățire de 24 ore
- Normalizarea concentrației PCR semnifică vindecarea clinică

Antibiototerapie ineficientă

- Creștere persistentă a PCR la sfârșitul curei de antibiotic prevestește recăderea sau recurența infecției
- Evoluția liniară (mai rar exponențială) a PCR ridică problema:

- dozării insuficiente a medicamentului antimicrobian
- rezistenței microbului infectant
- constituirii unui proces supurativ localizat
- unei boli de fond neinfecțioase (neoplazie malignă, necroze ș. a.) sau, în absența acestora
- semnului de prognostic grav

BACTERIOFAGI ȘI BACTERIOCINE

8.1. BACTERIOFAGI ȘI BACTERIOFAGIE

8.1.1. Date generale

Bacteriofagii, numiți pe scurt fagi, sunt virusuri ale bacteriilor. Li găsim prezenți în mediile naturale de viață ale gazdelor lor, bacteriile: materii fecale, diferite produse patologice, apă etc. Deși numele lor aparent o sugerează, bacteriofagii nu sunt «măncători» de bacterii, ci le lizează. În rezumat, fagii *se adsorb* specific pe receptori de pe suprafața bacteriilor, genomul lor *penetreză* în citoplasma bacteriană, unde evoluează în una din două modalități posibile:

- fie ca *fag vegetativ*, când este replicat, transcris și tradus integral, iar componentele sintetizate sunt asamblate în numeroase copii de fagi maturi eliberați prin liza bacteriei gazdă;

- fie ca *profag*, când integrat liniar în cromozomul bacterian sau circularizat și atașat la membrana citoplasmatică, asemenea unui plasmid, se replică sincron cu diviziunea bacteriei gazdă și câte o copie se transmite la fiecare din bacteriile fiice.

Fagi virulenți există numai în stadiile de fag matur și de fag vegetativ.

Fagi temperați trec alternativ prin stadii de fag matur, profag sau fag vegetativ. Genomul lor este mai complex: un set suplimentar de gene controlează represia genelor «vegetative» și recombinarea fagului în genomul bacteriei gazdă.

Bacteriile lizosensibile adsorb specific un fag, îl replică și sunt lizate.

Bacteriile lizogene găzduiesc un profag și îl transmit la descendenți. Denumirea este sugestivă pentru că aceste bacterii generează spontan, cu o rată de la 10^{-2} până la 10^{-5} , prin derepresia genelor vegetative, fagul matur infecțios (figura 8.1).

Sub acțiunea unor agenți mutageni (doze subletale de radiații ultraviolete etc.) aproape în toate celulele culturii lizogene profagul evoluează în fag vegetativ, care generează fagi maturi. Acest fenomen, numit *inducție*, are la bază inactivitatea enzimatică a represorului fagic, declanșată de mecanismul reparării ADN lezat prin agentul mutagen.

Bacteriile lizorezistente rezistă acțiunii litice a unui fag:

- fie pentru că sunt nereceptive (lipsite de receptori);
- fie pentru că sunt lizogene (adsorb fagul, dar îi neutralizează genomul prin represorul produs sub controlul profagului găzduit).

8.1.2. Metode de izolare a bacteriofagilor

Bacteriofagii sunt căutați în mediile lor naturale de viață, unde coexistă cu bacteriile gazdă.

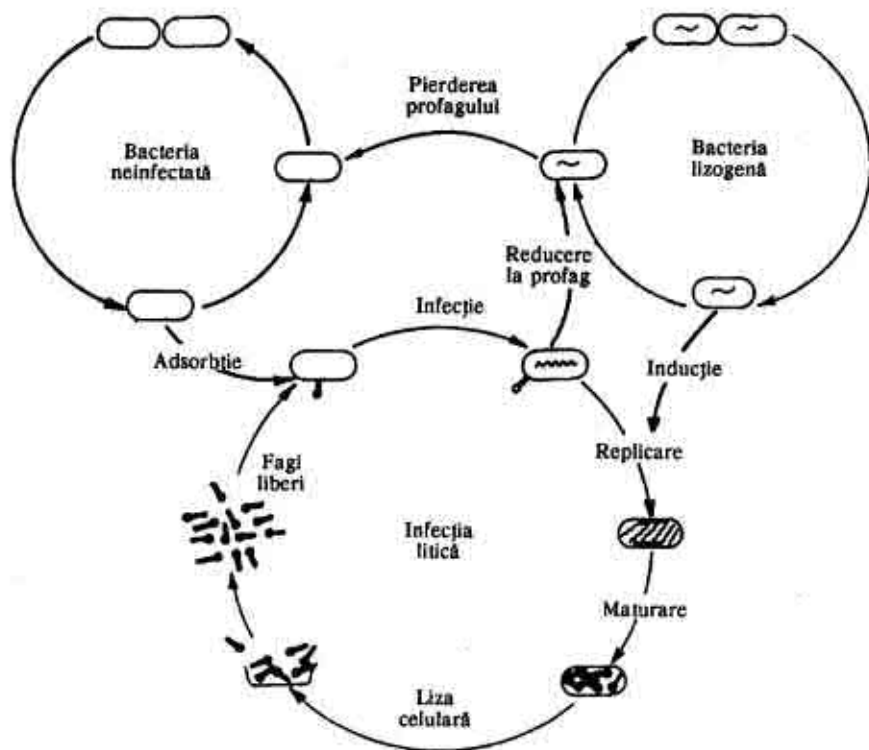


Fig. 8.1. Ciclurile fag—bacterie gazdă

Principiu: Bacteriofagii din probele de cercetat incubate în bulion nutritiv sunt replicați de bacteriile lizosensibile preexistente. Astfel înmulțiți, pot fi depistați în filtratul lizatului, folosind tulpini bacteriene indicatoare.

Probe: Materii fecale, urină, exsudate purulente, apă etc.

Necesar: Bulion nutritiv, incubator de 37°C, filtru care reține bacteriile, tulpini bacteriene indicatoare, plăci cu agar nutritiv, pipete, anse.

Procedura:

1. Se însămânțează cca 1 g de materii fecale, 1 ml urină sau exsudat, 30 ml apă în 30 ml bulion nutritiv.

2. Se incubează 18—24 ore la 37°C.

3. Se filtrează lizatului pentru reținerea bacteriilor (membrane cu pori de 0,22 μm, bujii Chamberland L₃ sau L₅ etc.).

4. Se testează filtratul cu tulpini indicatoare pentru prezența de bacteriofag (vezi 8.1.3).

Sensibilitatea metodei de izolare crește mult dacă la bulionul însămânțat cu proba cercetată se adaugă câteva picături din cultura de 2—3 ore a unei tulpini indicatoare (*multiplicare monovalentă*) sau a unui amestec de mai multe tulpini indicatoare (*multiplicare polivalentă*). Multiplicarea poate fi unică sau repetată mai multe zile la rând înainte de filtrare și testare. Prin multiplicare repetată se realizează nu numai îmbogățirea, ci și adaptarea bacteriofagului la gazda bacteriană.

8.1.3. Metode de indicare a bacteriofagului.

Indicarea fagului virulent

Principiu: Fagii dintr-o picătură de suspensie depusă pe suprafața mediului agarizat, însămânțată cu o tulpină bacteriană indicatoare, lizează complet bacteriile care îi replică, determinând o arie lipsită de cultură, numită *plajă*.

Tulpinile bacteriene indicatoare sunt tulpini selectate pentru lizosensibilitatea lor la anumiți bacteriofagi și absența lizogeniei.

Probă: Suspensie fagică (revedi 8.1.2).

Necesar: Cultură în fază exponențială a tulpinilor bacteriene indicatoare, plăci cu geloză nutritivă, etalor de inoculum, ansă.

Procedura:

1. Se usucă suprafața gelozei nutritive și se însămânțează în pânză suspensia bacteriei indicatoare cu toate celulele viabile (cultura în faza exponențială). Se lasă placa cu capacul întredeschis la 37°C, până ce inoculumul este complet adsorbit în mediu.

2. Se depune, cu ansa, pe suprafața însămânțată cu tulpina indicatoare o picătură din suspensia fagică și se lasă placa pe masa de lucru până ce picătura fagică este complet adsorbită în mediu.

3. Se incubează plăcile 8—16 ore la temperatura optimă pentru cultivarea tulpinii indicatoare.

Interpretare: Plajele apar ca mici zone rotunde de mediu lipsit complet de creștere bacteriană. Ele semnaleză prezența în suspensie a fagului corespunzător tulpinii indicatoare.

Depistarea bacteriilor lizogene. Diluții ale culturii lizogene sunt amestecate cu un mare exces din cultura tulpinii indicatoare, iar amestecul este imediat etalat pe suprafața unei plăci cu agar nutritiv și inoculumul lăsat să se adsoarbă în mediu. După incubarea corespunzătoare, în cultura tulpinii indicatoare se observă plaje centrate de o colonie a bacteriei lizogene. Fiecare colonie a bacteriei lizogene în care au fost generați fagi maturi s-a înconjurat cu o plajă prin liza bacteriilor indicatoare. Ținând cont de numărul plajelor, diluția și volumul însămânțat, poate fi calculată rata cu care cultura lizogenă generează fag matur, infectant.

8.1.4. Titrarea bacteriofagului

Principiu: Într-o cultură confluentă pe mediu agarizat fagul lizează bacteria lizosensibilă care l-a replicat și infectează numai bacteriile învecinate, determinând o plajă. Asumând că dispersia fagilor din suspensie este ideală, există o corespondență între plajă și o particulă fagică. Această cantitate de fag infectant se măsoară în *unități formatoare de plaje*.

Probă: Suspensie de fag proaspăt izolat (revedi 8.1.2) sau suspensii fagice de colecție, care periodic trebuie propagate și titrate.

Propagarea fagilor: În 100 ml bulion nutritiv se însămânțează bacteria lizosensibilă corespunzătoare și 4—5 ml din suspensia fagului de propagat. Se incubează 5—6 ore la 37°C, apoi se menține cultura peste noapte la 4°C, după care se filtrează.

Necesar: Bulion nutritiv, pipete gradate, eprubete sterile, placă cu geloză nutritivă, etalor, ansă fină.

Procedura:

1. Se menține peste noapte la 37°C placa cu geloză nutritivă pentru uscarea suprafeței mediului și controlul sterilității.
2. Se desenează un caroiaj pe fundul plăcii cu agar nutritiv.
3. Se efectuează diluții decimale în bulion nutritiv ale suspensiei fagice, schimbând pipeta după fiecare diluție.
4. Se însămânțează în pânză pe placa cu geloză nutritivă tulpina lizosensibilă corespunzătoare fagului de titrat și se lasă să se adsoarbă inoculul în mediu.
5. Se însămânțează în pătratele caroiajului câte o ansă din fiecare diluție a suspensiei fagice.
6. Se incubează placa la 37°C.

Interpretare: Titrul suspensiei fagice este stabilit de ultima diluție capabilă să producă minimum o plajă.

Preparațiile fagice titrate sunt conservate la 4°C.

8.1.5. Aplicații practice ale bacteriofagiei

Lizotipia.

Principiu: Unele tulpini ale aceleiași specii bacteriene sunt lizate total de un bacteriofag dat, altele numai parțial, iar altele deloc. Utilizând mai mulți fagi convenabil selectați (prin antrenare repetată pe aceeași tulpină bacteriană — vezi 8.1.2) subdivizarea unei specii sau serovar bacterian în tulpini sensibile, parțial sensibile și rezistente devine precisă. Un lizovar reunește tulpinile care reacționează la fel și constant față de preparațiile fagice selecționate. *Lizovarul este un valoros marker epidemiologic.*

Probă: Bacteria testată din cultura de 24 ore în bulion nutritiv este subcultivată pentru 2—3 ore în bulion nutritiv la 37°C.

Necesar: Setul de preparații fagice titrate, placă cu geloză nutritivă, etalor, ansă fină.

Procedura:

1. Se usucă suprafața gelozei nutritive și se verifică sterilitatea plăcii.
2. Se desenează pe fundul plăcii caroiajul corespunzător numărului de preparații fagice.
3. Se însămânțează în pânză tulpina testată și se lasă inoculul să se adsoarbă în mediu.
4. Se depune câte o ansă din fiecare preparație fagică în pătratul corespunzător al caroiajului.
5. Se incubează placa însămânțată la temperatura convenabilă fiecărui sistem fag—bacterie (37°C pentru majoritatea speciilor și 30°C pentru stafilococ) pe durata necesară apariției culturii.

Interpretare: Dimensiunea și morfologia plajelor produse de fiecare fag sunt apreciate în raport cu schemele de lizotipie standardizate pentru diferitele bacterii testate. Lizotipia a fost standardizată pentru bacterii patogene cum sunt: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, A, B, *S. typhimurium*, tulpinile enteropatogene de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* ș. a.

Alte aplicații.

■ *Indicatori sanitari*: distribuția bacteriofagilor în natură o reflectă pe cea a bacteriilor gazdă (revedi 8.1.2).

■ *Detecția substanțelor carcinogene* prin urmărirea inducției pe care o produc acestea în sistemele lizogene (revedi 8.1.3).

■ *Tratament adițional în infecțiile locale* (intestinale, urinare, cutanate) cu rezultate mai satisfăcătoare când fagul activ asupra bacteriei infectante poate fi aplicat direct în focarul infecțios.

8.2. BACTERIOCINE

Bacteriocinele sunt substanțe difuzibile, bactericide, codificate plasmidic și produse de anumite tulpini bacteriene.

În funcție de specia căreia îi aparțin, tulpinile producătoare, bacteriocinele pot avea denumiri particulare: colicine — cele produse de *E. coli*, piocine — cele produse de bacilul piocianic, megacine — cele produse de *Bacillus megatherium* etc.

Plasmidele care codifică bacteriocinele sunt numite factori *col*. Unele sunt conjugative (autotransferabile), altele neconjugative, dar pot fi cotransferate în prezența factorului de sex F sau transmise de către un bacteriofag.

Bacteriocinele se fixează pe receptori bacterieni specifici, sunt translocate prin învelișurile celulare (membrană externă, perete, membrană citoplasmatică) și acționează, cu efecte bactericide, asupra unor ținte celulare.

Spectrul antibacterian al bacteriocinelor este mult mai îngust decât cel al antibioticelor. Bacteriocinele produse de bacteriile gramnegative sunt active numai asupra unor tulpini ale speciei producătoare sau a unor specii ori genuri înrudite; cele produse de bacteriile grampozitive au spectru mai larg, extins și la bacterii taxonomic mai îndepărtate.

Implicații ecologice ale bacteriocinogeniei. Antagonismul exercitat de colicine (*E. coli* este bacteria facultativ anaerobă dominantă în colon — vezi tabelul 14.1) s-ar opune implantării în colon a unor patogeni ca bacilii dizenterici ș. a. Invers, bacteriocinele produse de tulpini patogene pot favoriza colonizarea și invazia intestinală, mai ales dacă flora rezidentă nu produce bacteriocine eficiente.

Aplicații practice. Specificitatea de receptor și țintă moleculară a bacteriocinelor poate diferenția bacteriile în funcție de:

■ Spectrul de activitate al bacteriocinei produse față de un set de tulpini indicatoare. Metoda se numește *bacteriocinogenotipie*.

■ Spectrul de sensibilitate al unei tulpini față de bacteriocine cunoscute. Metoda se numește *bacteriocinotipie*.

În general, caracterul producător este mai stabil decât sensibilitatea la bacteriocine. De aceea *bacteriocinogenotipia poate fi utilă în epidemiologie alături de lizotipie și serotipie*.

Pentru bacteriocinogenotipie, tulpina testată este însămânțată în striu de-a lungul diametrului unei plăci cu mediu agarizat 1,5%. După 48 ore de incubare la 37°C, cultura este raclată cu o lamă de sticlă sterilă, iar bacteriile restante sunt omorâte prin expunerea plăcii timp de o oră la vapori de cloroform. Pentru aceasta un pătrat de 5×5 cm din hârtie

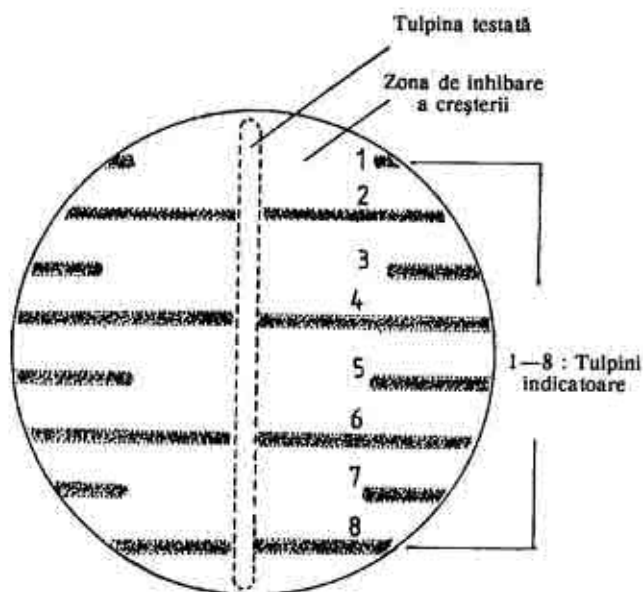


Fig. 8.2. Bacteriocinogenotipia prin metoda Abbott-Shannon

de filtru este plasat în capacul plăcii și îmbibat cu 1 ml cloroform. Apoi plăcile sunt aerisite 20 minute la 37°C cu capacul întredeschis. Tulpinile indicatoare sunt însămânțate perpendicular pe urma striului de cultură a tulpinii testate, iar placa incubată peste noapte la 37°C. Sunt semnificative zonele de inhibiție mai lungi de 2 mm pe striul tulpinilor indicatoare (figura 8.2). Interpretarea spectrului de activitate bacteriocinogenă a tulpinii testate se face după scheme standardizate.

Acceași metodă poate fi utilizată și pentru bacteriocinotipie. În acest caz tulpina bacteriocinogenă, cunoscută, este însămânțată în lungul unui diametru al plăcii, iar tulpinile testate perpendicular pe acesta.

METODA BIOLOGICĂ (EXPERIMENTALĂ) DE DIAGNOSTIC

9. 1. ASPECTE GENERALE

Inocularea experimentală la animale de laborator este utilă pentru izolarea unor microorganisme patogene din prelevate patologice sau pentru teste de patogenitate necesare identificării unor izolate.

Speciile curent folosite în aceste scopuri sunt: șoarecele, cobaiul, iepurele. Pentru rezultate concludente se impun:

1. alegerea speciei animale selectiv receptivă la microorganismul suspectat (tabelul 9.1);
2. probarea legăturii dintre simptomele și leziunile observate și microbul sau toxina inoculate. Trebuie eliminate: accidentul individual și accidente de cauză străină experimentului.

Tabelul 9.1. Exemple de utilizare a animalelor de laborator pentru izolarea sau identificarea unor microorganisme

Scopul inoculării	Specia indicată și calea de inoculare ¹			
	șoarece adult	șoricel nou-născuți (48 ore)	cobai	iepuri
<i>Izolare în cultură pură</i>				
Bacilii tuberculozei			s.c.	
<i>Borrelia</i>		i.p.		
<i>Brucella</i>			s.c./i.p.	
<i>Francisella tularensis</i>	i.p./s.c./p.c.			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (serotipurile K1, 2, 3)	s.c.			
<i>Leptospira</i>			Animale de 100—200 g i.p./p.c.	Animale până la 500 g i.p.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	s.c./i.p.			
<i>Coxiella burneti</i>			Masculi i.p.	

Scopul inoculării	Specia indicată și calea de inoculare ¹			
	șoarece adult	șoricel nou-născuț (48 ore)	cobal	iepuri
<i>Rickettsia prowazeki</i>			Masculi i.p.	
<i>R. typhi</i>			Masculi i.p.	
<i>R. rickettsii</i>			Masculi i.p.	
<i>R. conorii</i>			Masculi i.p.	
<i>R. acari</i>	i.p.			
<i>R. tsutsugamushi</i>	i.p.			
Arbovirusuri		i.c./i.p.		
Coxsackie		i.c./i.p.		
Herpes simplex		i.c./i.p.		
Rabic		i.c.		i.c.
<i>Teste de patogenitate</i>				
Virulență: <i>Listeria</i>			i.conj.	i.conj.
<i>Enteroinvazivitate</i>				
<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i>			i.conj.	
Enterotoxină termolabilă				i.d. inoculare în ansă ligaturată
Enterotoxină termos-tabilă		i.g.		
Toxină difterică			s.c./i.d.	i.d.
<i>Depistare-identificare</i>				
Toxină botulinică	i.p.			

¹ i.c. = intracerebral; i. conj. = intraconjunctival; i.d. = intradermic; i.g. = intragastric; i.p. = intraperitoneal; s.c. = subcutanat; p.c. = percutanat.

■ *Accidental individual* poate fi controlat dacă se inoculează cu fiecare probă cel puțin două animale.

■ *Accidente de cauză străină experimentului* sunt controlate dacă fiecare lot experimental este însoțit de *animale martor* inoculate cu soluție salină izotonă pe aceleași căi și în aceleași cantități ca și animalele din experiment. *Se vor inocula numai animale noi, sănătoase* (carantinate minimum trei săptămâni), *bine întreținute* (pentru a evita carențe nutritive, infecții intercurrente, fenomene de canibalism), *fără ectoparaziți* (pentru a preveni răspândirea epidemică a unora dintre microbii inoculați). Animalele gravide nu se inoculează, pentru că au o receptivitate diferită la infecție.

Animalele sănătoase sunt vioaie, au blana cu părul neted și lucios, fără ulcerații și cruste, au ochii limpezi fără scurgeri conjunctivale, nazale, otice sau anale, nu pierd din greutate în cursul unei săptămâni, au temperatura normală (tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Principalele constante biologice ale animalelor de laborator uzuale

Constante	Specii		
	șoareci	cobai	ieșuri
Temperatură, °C	37,4	37,6—38,9	38,7—39,1
Ritmul respirației, per minut		80	55
Ritmul pulsului, per minut	120	150	135
Globule roșii, $10^6/\text{mm}^3$	6,03—8,37	4,82—5,34	4,5—5,5
Leucocite, $10^3/\text{mm}^3$	8,4—15	7,80—10,4	8—12
<i>Formula leucocitară, %</i>			
Linfocite	40—70	39—59	24—40
Polinucleare neutrofile	30—50		
Polinucleare amfofile ¹		40—50	40—55
Polinucleare eozinofile	1—2	1—5	1—2
Polinucleare bazofile	1		
Monocite	1—3	3—6	5—15
Vârsta fecundității, săptămâni	6—8	12—20	24—36
Ciclu oestral, zile	4—5		
Gestație, zile	19—21	59—72	28—31
Fătări, per an	8—12	3	4
Îngrijirea puilor, săptămâni	7—8	3	4
¹ Polinucleare amfofile cu granulații roz în colorația Giemsa			

Aspectele tehnice ale înmulțirii, creșterii și întreținerii animalelor de laborator, diagnosticul, tratamentul, combaterea și profilaxia principalelor boli naturale care le afectează depășesc obiectivele acestei cărți: pot fi găsite în manuale de zootehnie și de medicină veterinară.

Măsurile de protecție antiepidemică a personalului și colectivității în laboratoarele unde se infectează experimental animale de laborator sunt descrise cu amănunte în manualele O.M.S. (O.M.S., 1983) și ale Serviciului de Sănătate Publică al S.U.A. (USPHS, 1984).

În continuare vom descrie numai: conținutul, inocularea, marcarea, supravegherea, prelevarea de probe, necropsia animalelor de laborator și distrugerea cadavrelor.

9.2. CONTENȚIUNEA ANIMALELOR DE LABORATOR

O bună contențiune a animalelor de laborator este indispensabilă inoculării lor, termometrării și prelevării corecte de probe fără riscul zgârieturilor și mușcăturilor.

Cobaiul. Cu mâna dreaptă, ajutorul apucă animalul de centura scapulară, cuprinzând toracele și membrele anterioare. Capul rămâne liber între police și index. Mâna stângă imobilizează una sau ambele labe posterioare și prezintă animalul operatorului pentru inoculare. Animalul trebuie manipulat blând, dar ferm, fără a-l strânge exagerat de torace.

Șoarecele trebuie manipulat cu atenție, pentru că mușcă. Cu mâna dreaptă este apucat de vârful cozii și plasat pe un plan rugos (masă, capacul borcanului) de care se prinde cu ghearele. Se prinde pielea laxă a cefei între policele și indexul mâinii stângi. Mâna dreaptă continuă să țină coada și imobilizează labele posterioare. Imobilizarea poate fi făcută și de operator singur.

Iepurele. Cu o mână se netezesc urechile pe ceafă și se apucă animalul de pielea laxă a spatelui. Cealaltă mână susține partea posterioară a animalului, pentru a-l ridica ușor din cușcă. Animalul este pus pe masă, iar ajutorul îl imobilizează între piept și antebrațe.

Aparatele de contențiune permit contențiunea pentru inoculări mai laborioase sau când operatorul lucrează singur. Așa este aparatul Latapie, care imobilizează capul, toracele și abdomenul cobaiului sau iepurelui. Puncția venei marginale a urechii iepurelui poate fi făcută cu animalul imobilizat într-o cutie cu capac glisant care lasă afară numai capul animalului, iar puncția venelor cozii la șoarece se face cu animalul imobilizat într-o cutie cu capac glisant sau într-un cilindru care lasă afară numai coada.

Anestezierea este necesară pentru inoculările sau prelevările mai laborioase. Uzuală este anestezia generală cu eter. Șoarecele sau cobaiul este plasat într-un exsicator din sticlă sub sita căruia se pune un tampon îmbibat cu eter. Imediat ce animalul își pierde conștiința, este scos pe masă și poate fi manipulat în această stare 3—4 minute. Pentru operații mai lungi pe botul animalului se aplică o mască, adecvată profilului, care conține un tampon îmbibat cu eter. Distanța dintre tampon și nările animalului trebuie să fie suficientă, pentru a evita efectul foarte iritant al eterului lichid asupra mucoasei nazale. Anestezierea iepurelui necesită o cutie ermetic închisă prevăzută cu un tub prin care se introduce amestecul aer—eter și un vizor pentru a urmări starea animalului. Anestezierea pentru 1—2 ore se obține cu 28 mg/kg corp pentobarbitonă sodică (nembotal) injectată intravenos la iepure sau intraperitoneal la cobai.

9.3. PUNCȚII ȘI INOCULĂRI

Inocularea se face cu seringi și ace de mărimi adecvate, sterile, după prealabilă antiseptizare a tegumentului cu alcool. Se va controla etanșeitățile seringilor, adaptarea corectă a acelor, iar operatorul va purta mănuși de cauciuc și ochelari de protecție, pentru a preveni contaminarea accidentală a pielii și conjunctivei cu materialul inoculat.

Materialul microbial de inoculat poate fi reprezentat de:

- culturi microbiene în bulion nutritiv sau suspensii ale culturilor pe medii agarizate;
- filtratul sau supernatantul culturilor în bulion nutritiv;
- prelevate patologice fluide sau omogenizate în soluție salină izotonică.

9.3.1. Injectarea intradermică

Este *calea de elecție* pentru testarea toxinelor dermonecrotice sau edematogene și pentru testarea sensibilizărilor. Se practică la iepuri și cobai de culoare albă.

Necesar:

■ seringi de 1 ml gradate în 1/20 ml, cu ace cât mai scurte, cu bizou scurt și diametrul de 0,6 mm;

- foarfece;
- amestec depilator:

Sulfură de bariu (Merck)	50 g
Oxid de zinc	35 g
Amidon	60 g

Procedură: Animalul este tuns scurt pe flancuri sau/și pielea spatelui, în funcție de numărul punctelor de injectare necesare. Pe pielea tunsă și umezită se aplică o pastă subțire, cu apă, din amestecul depilator precizat mai sus. După 2 minute pasta este îndepărtată blând împreună cu părul folosind o spatulă de lemn. Tegumentul depilat, spălat cu apă și uns cu puțină glicerină este gata de injectare.

Pielea este fixată între police și index, iar acul se înfinge tangențial în partea superioară a pliului cutanat până când bizoul, plasat în sus, intră complet în derm. Se inoculează încet 0,1—0,2 ml produs. Injectarea strict intradermică este atestată prin formarea unei bule bine conturate cât un bob de mazăre, pe care pielea decolorată are aspectul coji de portocală.

9.3.2. Inocularea percutană, prin scarificare

În regiunea indicată (vezi mai jos) pielea depilată (vezi 9.3.1) este antiseptizată cu alcool și lăsată să se usuce. Cu vârful unui bisturiu bine ascuțit, steril, se fac zgârieturi paralele în piele, suficient de profunde, pentru apariția limfei, fără a provoca însă sângere. Metoda este *indicată* pentru:

- propagarea virusului vaccinal la iepuri: pe flancurile scarificate ale animalului, materialul infecțios este frecat cu latul lamei bisturiului de scarificare;
- izolarea pe cobai a leptospirelor din apă: animalul, cu pielea abdomenului scarificată, este imersat timp de 2—4 ore în proba de apă la 22—37°C.

9.3.3. Injectarea subcutanată

Este *calea de elecție* pentru inocularea prelevatelor patologice cu floră de asociație. Se mai pot inocula suspensii microbiene ori, pentru testarea toxinelor, filtratul sau supernatantul unor culturi bacteriene.

Necesar: Seringi de 1—2 ml și ace cu bizou lung de 30/0,8 mm sau 1,0 mm, în raport cu vâscozitatea produsului.

Procedură: Depilarea locului de puncție prin smulgerea părului este necesară la iepuri și cobai. După antiseptizarea regiunii cu alcool, între police și index se face un pli cutanat, iar acul se introduce la baza pliului până în țesutul celular subcutanat. La șoareci se puncționează pielea spatelui la rădăcina cozii; se injectează până la 0,5 ml. La cobai se puncționează pielea pe fața internă a coapsei drepte, aproape de pliul inghinal, iar la iepuri pielea abdomenului, flancurilor ori cefei și se injectează până la 2 ml.

9.3.4. Injectarea intramusculară

Este rar utilizată. Se întrebunțează aceleași materiale ca la injectarea subcutanată, dar acul este înfipt oblic în masa musculară a coapsei (cobai) sau în mușchii cefei (iepuri).

9.3.5. Injectarea intraperitoneală

Este indicată pentru injectarea de prelevate patologice fără floră de asociație, în special la șoareci sau cobai.

Necesar: vezi 9.3.3.

Se procedează, inițial, ca pentru puncția subcutanată, zona de elecțiune fiind paraombilicală. Acul se introduce subcutanat cca 1 cm; apoi este direcționat perpendicular, se perforează peretele muscular și se penetrează cca 1 cm în cavitatea peritoneală. Se pot injecta cca 1 ml la șoarece și câțiva ml la cobai.

9.3.6. Injectarea intravenoasă

Necesar: Seringă de 2—5 ml cu ac de 30/0,6 sau 0,8 mm pentru iepuri sau seringă pentru intradermoreacție cu ac de 10/0,5 mm și bizou perfect ascuțit pentru șoareci.

Procedură: Se va elimina din seringă orice bulă de aer, pentru a preveni embolii.

La iepuri se puncționează vena marginală a urechii, evidențiată cât mai bine prin frecarea pielii cu un tampon de vată imbibat cu alcool sau xilol și compresia părții proximale a venei. Cu acul paralel cu vena și ușor oblic față de suprafața urechii se puncționează blând, cu grijă bizoul să nu treacă dincolo de venă. Se controlează poziția acului aspirând puțin sânge în seringă, apoi se injectează lent produsul observând zona puncționată. Dacă la nivelul puncției apare o umflătură, se oprește injectarea, pentru că acul nefiind în venă lichidul se infiltrează în piele. La sfârșit se retrage acul și se face hemostaza cu un tampon de vată comprimat pe orificiul de puncție cu o pensă.

La șoareci se puncționează una din cele patru vene ale cozii. Șoarecele este plasat în dispozitivul de contențiune. Se antisepticizează cu alcool zona mijlocie a cozii. Operatorul ține cu mâna stângă vârful cozii, iar cu dreapta seringă. Vena aleasă este puncționată ținând acul aproape paralel cu pielea. Dacă se întâmpină rezistență la injectare, acul nu este în venă. Se pot injecta 0,5 ml. Apariția unei mici picături de sânge la retragerea acului atestă injectarea intravenoasă a fluidului.

9.3.7. Inoculări oculare

În *sacul conjunctival*, la iepure sau cobai, se pot instila cu pipetă Pasteur 1—2 picături de cultură bacteriană în bulion nutritiv. Instilarea la iepure se face în unghiul posterior al ochiului, pentru a evita a treia pleopă, care se inserează în unghiul anterior. Alternativ, ansa cu care a fost prelevată o colonie bacteriană este introdusă sub pleoapa ochiului la cobai și se fac mișcări adecvate pentru descărcarea conținutului, cu grijă pentru a nu leza conjunctiva.

O *inoculare intracorneană* se poate face prin scarificare după anestezia iepurelui.

9.3.8. Injectarea intracerebrala

Necesar: Seringă intradermică prevăzută cu ac de 10/0,5 mm; bisturiu, trepan, material de sutură, soluție de colodiu.

Procedura: Pentru injectare animalele sunt anesteziate cu eter. *La șoarece* pielea capului se antiseptizează cu alcool. Craniul este puncționat cu acul la jumătatea distanței dintre unghiul extern al ochiului și inserția pavilionului urechii, 3 mm paramedian. Acul pătrunde 3—6 mm și se injectează până la 0,03 ml fluid.

La iepure pielea depilată a capului este antiseptizată cu tinctură de iod, ștersă apoi cu alcool. Se face o mică incizie la 2 mm lateral de sutura sagitală și 1,5 mm anterior celei lamboide și se trepanează osul. Acul pătrunde prin trepanație 6—8 mm și se inoculează până la 0,45 ml fluid în lobul occipital. După injectare, acul este retras repede, pielea suturată și plaga acoperită cu soluție de colodiu.

9.3.9. Injectarea șoricilor sugari

Mamele și cuibul trebuie bine întreținute, iar șoricii manipulați curat și cu grijă, pentru a evita canibalismul matern. Cu o seringă intradermică prevăzută cu ac de 10/0,5 mm se pot injecta 0,05 ml intraperitoneal sau intragastric și 0,03 ml subcutanat sau intracerebral.

9.4. MARCAREA

Toate animalele inoculate trebuie marcate pentru identificare ușoară și sigură. Șoarecii și cobaii sunt vopsiți pe cap sau/și pe spate cu albastru sau/și roșu cu soluțiile de albastru de metilen sau fucsină folosite pentru colorarea bacteriilor. Cobaii și iepurii pot fi marcați cu discuri colorate sau numerotate fixate pe pavilionul urechii.

9.5. SURPAVEGHEREA ANIMALELOR INOCULATE

Animalele inoculate sunt urmărite zilnic pentru a înregistra: starea generală (poziția, aspectul părului), respirația, temperatura, greutatea, leziuni la locul de inoculare, inclusiv ganglionii limfatici regionali, tulburări nervoase (convulsii, paralizii). Aceste observații se

completează cu examenul unor prelevate *intravitam* (e. g. sânge), examene anatomopatologice și microbiologice necroptice.

9.5.1. Termometrizarea

Se măsoară și se înregistrează, dimineața și seara, înainte de hrănire, temperatura rectală timp de câteva zile înainte de inocularea animalelor (tabelul 9.2) și pe durata observației. Termometrul este lubrefiat cu ulei de parafină.

La *iepur* se poate folosi un termometru medical inserat 2 cm în rect.

Pentru *cobai* se folosesc termometre speciale cu calibru de 4 mm, lungime de 15 cm cuate în unghi de 135° C la 4 cm de extremitatea cu rezervorul de mercur. Termometrul se inserează pe o profunzime de cca 8 cm cu rezervorul de mercur direcționat în sus și către înapoi pentru a depăși promontoriul.

9.5.2. Prelevări de sânge

Sunt necesare pentru detectarea anticorpilor apăruiți în cursul infecției experimentale.

De la *iepur* cantități până la 10 ml de sânge pot fi obținute prin puncție și aspirație din vena marginală a urechii (vezi 9.3.6). Pentru cantități mai mari (cca 50 ml sânge/kg corp) se puncționează cordul. Animalul este imobilizat în decubit dorsal. Tegumentul precordial este depilat (prin smulgere) și antiseptizat. Cu un ac de 0,8 mm montat la o seringă se puncționează perpendicular toracele într-un punct situat în spațiul III intercostal (cca 4 cm mai sus de unghiul condroxifoidian) la 3 mm de marginea stângă a sternului. Se inserează acul pe o profunzime de cca 1,5 cm și se aspiră. Poate fi folosit și un dispozitiv format dintr-o pipetă cu bulă adaptată pentru puncție-aspirație sterilizat la autoclav. Sângele prelevat este imediat transvazat și agitat, pentru defibrinare, într-un balon cu perle de sticlă.

De la *cobai* cantități până la 0,5 ml sânge se obțin prin incizia venei marginale a urechii. Cantități de 12—15 ml de sânge per animal de 400 g se obțin prin puncția cordului procedând ca la iepure cu următoarele repere: puncție în spațiul II intercostal (cca 1,5 cm mai sus de unghiul condroxifoidian) la 1,5 mm în afara marginii stângi a sternului, la profunzimea de 1 cm.

De la *șoarece* se pot obține câteva picături de sânge secționând vârful cozii. O cantitate mai mare se obține, sub anestezie, prin deplasarea globului ocular și puncția plexului venos retroorbital cu o pipetă Pasteur fină, care, după puncționare, se înclină până ce sângele începe să se scurgă prin capilar.

9.6. SACRIFICAREA

Metodele fizice implică ruperea măduvei spinale în regiunea cervicală prin comprimare puternică și bruscă a gâtului pe o muchie dură. Asigură moartea instantaneu și fără dureri a șoarecilor și cobailor.

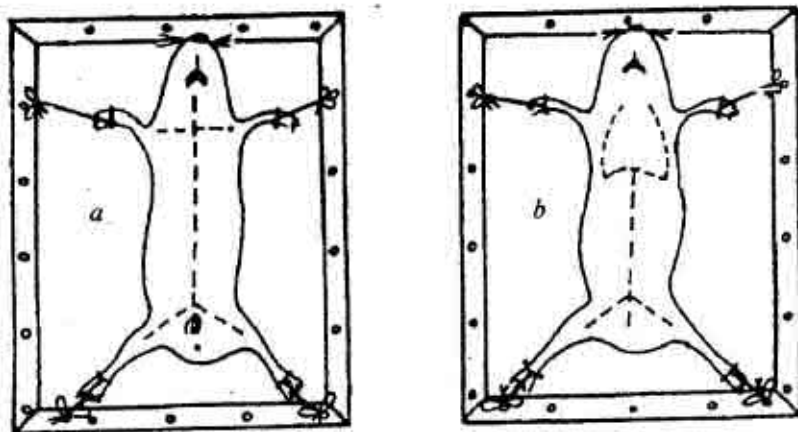


Fig. 9.1 Traieciul inciziilor pentru necropsierea animalelor de laborator: a — incizia tegumentului; b — incizia planului musculoaponevrotic abdominal și al toracelui

Embolizarea venoasă poate fi utilizată la iepuri: se injectează 20 ml aer în vena marginală a urechii.

Metode chimice. Într-un cilindru, dimensionat după talia animalelor și obturat la o extremitate, se introduce un tampon de vată imbibat cu cloroform. Animalele mici se introduc cu totul în acest cilindru, la iepuri numai capul. Cobaii sunt sacrificați ușor prin injectarea subcutanată a 0,5 ml amital sodic.

9.7. NECROPSIA

Animalele trebuie necropsiate în maximum o oră după moarte sau sacrificare, pentru a evita invadarea țesuturilor cu flora de putrefacție.

Necesar:

- tavă de tablă cu margini perforate pentru fixarea cobailor sau iepurilor; mică planșetă de lemn pentru fixarea șoarecilor;
- instrumente sterile: 3 bisturie, 4 foarfece, 4 pense anatomice; clește mic pentru oasele craniului, dacă se impune accesul la creier;
- pipete Pasteur, cutii Petri și eprubete sterile, lame de microscop;
- plăci și tuburi cu medii de cultură adecvate.

Procedura:

1. Se fixează animalul cu fața ventrală în sus, iar pentru accesul la creier cu fața ventrală în jos.

2. Se badijonează insistent toată fața ventrală a animalului cu o soluție 3% de dezinfectant fenolic. Animalele mici pot fi cufundate complet în soluția dezinfectantă. Aceasta nu distruge în totalitate microorganismele de pe suprafața pielii, dar previne răspândirea de pulberi contaminate în aer și pe suprafețele din jur. Se plasează în jurul capului și membrilor posterioare suluri de hârtie igienică imbibată cu dezinfectant.

3. Cu un rând de instrumente sterile se face o incizie tegumentară submentopubiană prelungită spre rădăcina fiecărui membru (fig. 9.1, a) și se decolează pielea până pe flancuri.

4. Se inspectează țesutul celular subcutanat, masele musculare și ganglionii limfatici în regiunea de inoculare.

5. Cu un nou rând de instrumente sterile se deschide cavitatea peritoneală și se reflectă lateral planul musculoaponevrotic.

Cu foarfece sterile adecvate se secționează, prin două incizii laterale, cartilajele costale (fig. 9.1, b), apoi diafragul și se îndepărtează plastronul sternal.

6. Pentru hemocultură se puncționează cordul cu o pipetă Pasteur prevăzută cu tetină de cauciuc. Dacă necropsia este îngrijită nu este necesară cauterizarea suprafeței puncționale. Se însămânțează sângele extras în medii de cultură adecvate.

7. Cu un nou rând de instrumente sterile se prelevă și se depune în cutii Petri sterile, pentru examinare, splina, ficatul, rinichii și pulmonii. Atenție la prelevare pentru a nu deschide tubul digestiv.

8. Se examinează macroscopic, se secționează cu instrumente sterile organele prelevate, se însămânțează în medii adecvate mici fragmente de țesut și se efectuează amprente pentru microscopie.

9. Se acoperă carcasa animalului cu o bucată de hârtie igienică imbibată cu soluție dezinfectantă. Se autoclavează carcasa împreună cu tava, apoi se incinerează carcasa animalului.

10. Se dezinfectează prin fierbere sau chimic instrumentarul în vederea spălării.

NOTĂ: La necropsierea animalelor infectate cu microorganisme înalt patogene sunt utilizate mănuși de cauciuc, ochelari sau vizor.

METODA IMUNOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

Reacțiile anticorpilor sau limfocitelor specific sensibilizate cu agenții infecțioși asigură imunitatea fie în mod direct (e. g. prin neutralizarea toxinelor, a adezinelor, a virusurilor), fie prin amorsarea specifică a importanților efectori antiinfecțioși ai mediului intern: fagocitele cu întregul lor arsenal microbicid (dependent sau independent de mieloperoxidază) și complementul.

În acest capitol vom vedea pe rând noțiuni privind:

- explorarea capacităților funcționale ale efectorilor antiinfecțioși nespecifici ai mediului intern și epitelilor secretorii: fagocite, complement, lizozim;
- explorarea imunității celulare și umorale atât pentru scopuri diagnostice, cât și pentru aprecierea capacităților imunoreactive ale pacienților.

10.1. FACTORII REZISTENȚEI NATURALE A ORGANISMULUI: FAGOCITOZA, COMPLEMENTUL, LIZOZIMUL

10.1.1. Explorarea unor funcții fagocitare

Fagocitoza presupune: chemotaxia, recunoașterea țintei de atac, ingestia, omorârea și digestia microbilor. Principalele sisteme fagocitare ale organismului sunt: sistemul fagocitar mononuclear și leucocitele polimorfonucleare neutrofile (PMN).

■ *Chemotaxia.* Fagocitele receptează semnale chemotactice prin care identifică locul invaziei microbilor spre care se mobilizează prin emiteră de pseudopode. Secvența tripeptidică formilmetionilleucocilfenilalanină de la extremitatea N-terminală a proteinelor bacteriene este o chemotaxină activă, dar principalii factori chemotactici sunt complexul C5b67 și anafilatoxinele generate prin activarea complementului (figura 10.2). PMN având o mobilitate mai mare decât monocitele, ajung primele în focarul de infecție.

■ *Recunoașterea țintei de atac.* Atașarea particulelor străine la membrana fagocitelor este indispensabilă pentru ingestie. Unii microbi (ca streptococii viridans) sunt fagocitați direct. Alții însă nu realizează atașarea la membrana fagocitului, deoarece au suprafața hidrofilă și sarcina electronegativă ca și fagocitele, și, pentru a fi fagocitați, trebuie opsonizați. *Opsonizarea* se realizează de factori serici nespecifici (fracțiunea C3b) sau specifici (anticorpui), care fixați pe suprafața bacteriilor îi reduc hidrofilia și sarcina electronegativă, funcționând și ca liganzi la receptori de membrană ai fagocitelor.

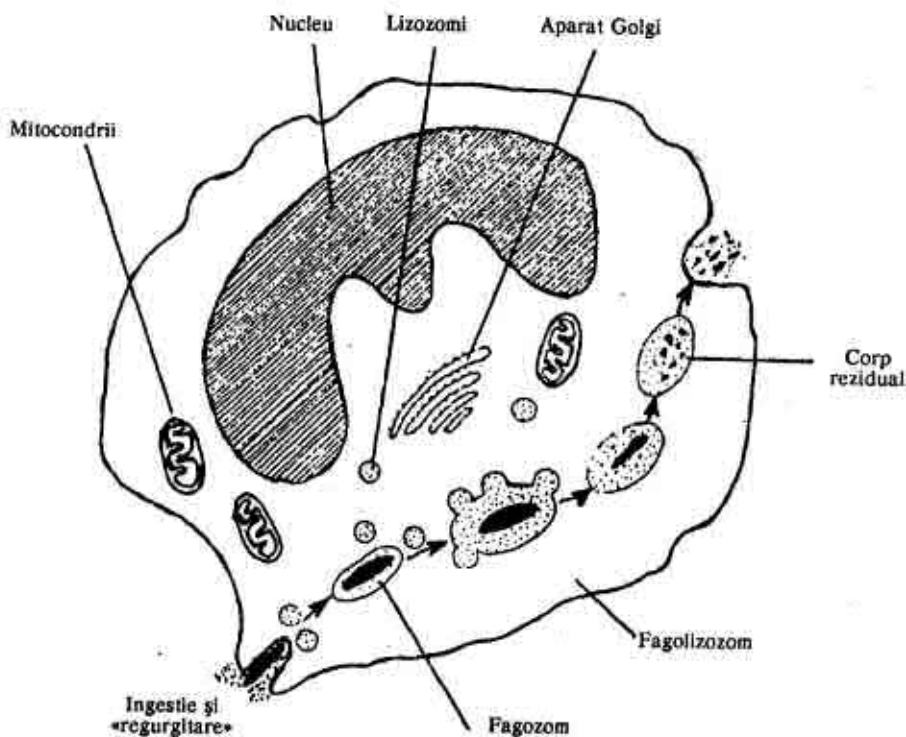


Fig. 10.1. Fagocitarea unui bacil, schematic. Prin fuziunea membranelor conținutul lizozomal este «regurgitat» în cursul ingestiei, iar ulterior se formează fagolizozomul în care bacteria este omorâtă și digerată sau reținută într-un corp rezidual, din care poate fi excretată prin fuziunea cu membrana citoplasmică

■ **Ingestia.** Fuziunea pseudopodelor închide într-un fagozom particula atașată la membrana celulară (figura 10.1). O dată cu progresarea ingestiei, în fagocit ce declanșează *degranularea și o explozie respiratorie*, care pregătesc omorârea și digestia microbilor.

Degranularea: lizozomii fuzionează cu membrana citoplasmică și cu cea a fagozomului și își descarcă conținutul atât în exterior («regurgitare» înainte de închiderea fagozomului), cât și în fagozom. «Regurgitarea» joacă un rol important în mecanismele microbicide din focarul inflamator.

Explozia respiratorie stimulează șuntul hexozomonofosfat și generează în fagozom superoxid, iar prin dismutarea acestuia, peroxid de hidrogen.

■ **Omorârea și digestia.** Factorii lizozomali acumulați în fagolizozom omoară microbii prin două mecanisme: unul dependent de mieloperoxidază, altul independent.

Mieloperoxidaza, activată de pH-ul acid din fagolizozom, descompune H_2O_2 cu formare de oxigen molecular, care generează radicali microbicizi: hipoclorit prin oxidarea clorului și aldehide prin peroxidarea membranelor.

Mecanismul independent de mieloperoxidază, activ în condiții anaerobe, implică: scăderea pH-ului prin acidul lactic rezultat din fermentarea glucozei, fixarea fierului prin lactoferină, efectul bactericid al lizozimului și al polipeptidelor bazice din lizozomii PMN. Microbii omorâți sunt digerați de enzimele lizozomale hidrolitice deversate în fagozom.

Defecte ale funcțiilor PMN pot să apară în diferite boli ereditare sau dobândite. Chemotaxia este deficitară la pacienții cu sindrom Chediak-Higashi, la diabeticii în dezechilibru metabolic etc. Defecte ale activității *-cide* intracelulare sunt prezente la

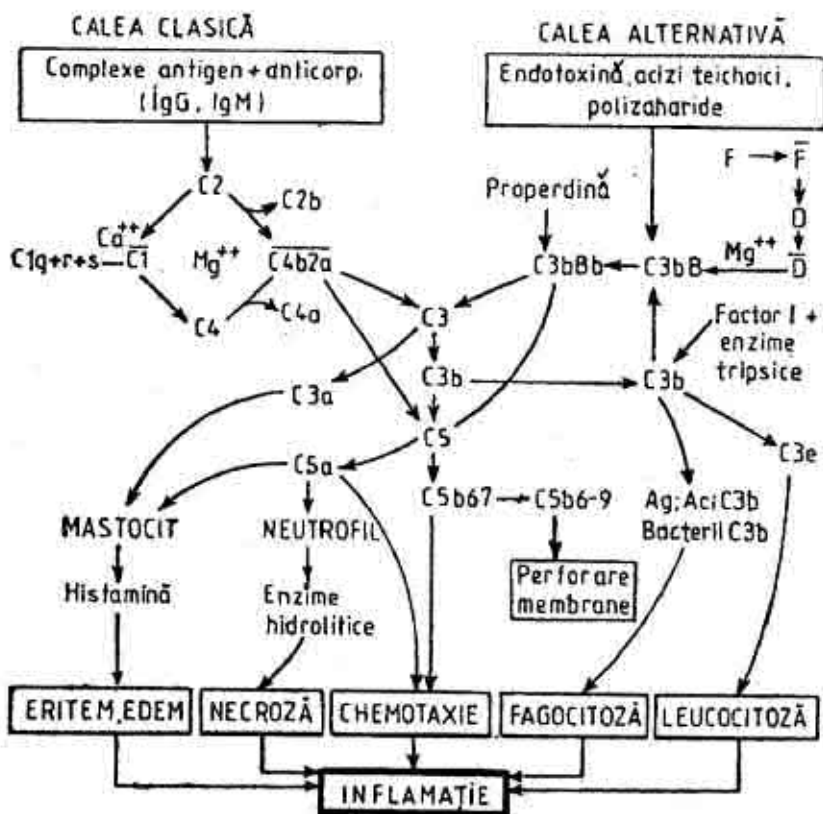


Fig. 10.2. Sistemul complement: căile de activare și efectorii

pacienții cu boală granulomatoasă cronică etc. Toți acești pacienți au o receptivitate crescută la infecții.

Mai multe teste sunt indicate pentru explorarea funcțiilor complexe ale fagocitelor. Ansamblul acestor teste depășește obiectivele acestui manual. Ne vom opri doar asupra celor mai accesibile, al căror rezultat indică sau nu necesitatea unor testări suplimentare (tabelul 10.1).

Tabelul 10.1. Explorarea funcțională a leucocitelor polimorfonucleare neutrofile

- | |
|--|
| <p>Leucograma cu formula leucocitară</p> <p>Morfologia polimorfonuclearelor neutrofile</p> <p>Migrarea nedirecționată (la întâmplare)</p> <p>Migrarea direcționată (chemotaxia)</p> <p>Indicele opsonic</p> <p>Indicele fagocitar și bactericid</p> <p>Activități postfagocitare:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Degranularea ■ Testul cu <i>nitroblue tetrazolium</i> (NTB) ■ Testarea activității șuntului hexozomonofosfat ■ Testarea producerii radicalului superoxid ■ Iodurarea bacteriilor ■ Chimioluminescența |
|--|

1. Leucograma cu formula leucocitară și morfologia PMN sunt cele mai simple și importante teste care inițiază studiul anomaliilor funcționale ale PMN (vezi lucrările practice de histologie, morfopatologie și hematologie).

2. Testul cu NTB. *Indicații:* Investigarea capacității PMN de a-și stimula metabolismul oxidativ după fagocitare.

Principiu: Nitroblue tetrazoliu (NTB), un colorant galben, formează complexe cu fibrinogenul din sânge, captate de PMN stimulate prin fagocitarea unor particule (bacterii etc.). Colorantul este redus enzimatic cu formare de formazan insolubil, care apare la microscop ca cristale albastre-purpuriu.

Probă: Sânge integral la pacienții cu număr normal sau crescut de leucocite. Concentrat leucocitar la pacienții cu leucopenie.

Necesar:

a) Sticlule cu Na₂EDTA uscat. În sticlule de 10 ml (flacoane de penicilină foarte bine spălate) se repartizează din soluția 1% Na₂EDTA câte 0,2 ml sau 0,5 ml pentru tehnica cu sânge integral, respectiv pentru cea cu concentrat leucocitar. Sticlulele se lasă, fără dop, peste noapte la 37°C pentru evaporarea apei. Astfel vor conține 2 mg și, corespunzător, 5 mg anticoagulant.

b) Soluția stock 1% de NTB:

NTB	10 mg
Apă distilată	1 ml

Se păstrează mai multe luni la 4°C în tub ermetic închis.

c) Tampon Michaelis cu pH 7,4:

Soluție acetat-veronal	5 ml
HCl soluție 0,1 N	5 ml
NaCl soluție neutră 0,85%	90 ml
Se verifică pH-ul și se păstrează la 4°C	
Na acetat	19,428 g
Na veronal	29,428 g
Apă distilată ad	1000 ml

Procedură:

■ *Pentru sângele integral:*

a) Se prelevă prin venipunctură 1—2 ml sânge în flacon cu 2 mg Na₂EDTA. Se agită.

b) Se amestecă într-un tub 100/10 mm cu dop de vată umezit:

Tampon Michaelis cu pH 7,4	0,08 ml
NTB soluție 1%	0,02 ml
Probă de sânge	0,10 ml

c) Se incubează 30 minute la 37°C.

d) Se agită, se întind frotiuri subțiri.

e) Se colorează Giemsa:

— fixare cu alcool metilic pe 5 minute;

— colorare cu soluția Giemsa (1 picătură la 1 ml apă distilată neutră) 20 min.

f) Se examinează la microscop cu imersia 100 PMN consecutive și se înregistrează separat cele NTB-pozitive (cu cristale albastre-purpuriu de formazan) de cele NTB-negative (fără cristale de formazan).

■ *Pentru concentratul leucocitar:*

- a) Se prelevă prin venipunctură 5 ml sânge în flacon cu 5 mg Na₂EDTA. Se agită.
- b) Se toarnă proba într-un tub de 100/10 mm și acesta se menține o oră la 37°C înclinat la 45°.
- c) Se prelevă cu o pipetă Pasteur plasma tulbure și se transvazează într-un tub de 100/10 mm.
- d) Se centrifughează 5 minute la 3000 rpm.
- e) Se decantează absorbind îngrijit resturile de supernatant cu hârtie de filtru.
- f) Se procedează în continuare conform punctelor b)–f) de la procedura pentru sânge integral.

Rezultatul: Se exprimă în procente de polimorfonucleare NTB-pozitive.

Interpretare: În sângele persoanelor normale proporția polimorfonuclearelor NTB-pozitive nu depășește 14%. La pacienții normoreactivi infecțiile bacteriene determină creșteri masive ale procentului de celule NTB-pozitive, iar cele virale nu-l modifică semnificativ.

La copii cu boală granulomatoasă cronică, chiar în plin puseu de infecție bacteriană, polimorfonuclearele NTB-pozitive lipsesc.

3. **Indicele opsonic** explorează capacitatea opsonică a serului și fagocitară a leucocitelor. Un amestec de sânge citratat și suspensie bacteriană standardizată este menținut într-un tub capilar timp de 15 minute la 37°C. Se fac frotiuri subțiri, se colorează Giemsa, iar bacteriile conținute în 50–100 PMN sunt numărate. Raportul dintre numărul mediu al bacteriilor fagocitate de PMN din sângele bolnavului și al unei persoane normale constituie indicele opsonic, care trebuie interpretat în contextul nivelului complementului și imunoglobulinelor serice (vezi mai jos). Erorile metodei sunt mari. De aceea se preferă determinarea *indicele fagocitar și bactericid*.

Indicele fagocitar și bactericid. În principiu, în condiții standardizate, se calculează în prezența serului sangvin rata de fagocitare a unei suspensii bacteriene (*S. aureus* sau *E. coli*) și omorârea intracelulară la pacient comparativ cu un martor normal.

Indicele fagocitar este diferența dintre numărul bacteriilor vii adăugate suspensiei de fagocite și numărul bacteriilor vii rămase în momentul *t* de incubare (până la 30 minute). Similar se calculează *indicele bactericid*, luând însă în considerație numărul bacteriilor vii intracelulare în momentul inițial al observației și în momentul *t* de incubare. Pentru aceasta este necesară liza fagocitelor (e. g. cu saponină).

10.1.2. Explorarea sistemului complement

Sistemul complement este un complex de 15 substanțe proteice dotat cu capacități biologice potențiale, declanșate printr-o cascadă de reacții enzimaticе, al căror rol în apărarea antiinfecțioasă este ilustrat în figura 10.2.

Liza hematiilor sensibilizate cu anticorpi antihematii permite *dozarea activității complementului total*. Imunochimiștii ne pun însă la dispoziție în prezent seruri monospecifice față de componentele complementului prin care le putem doza satisfăcător și mai simplu, folosind testul Mancini.

Deficitul unor componente ale sistemului complement explică receptivitatea deosebită la anumite infecții (e. g. meningococice etc.). Componenta C3 în special scade, prin consum, în boli de sensibilizare prin mecanism de tip III. Multe din componentele complementului (C1s, C2-C6, B) sunt reactivi de fază acută și concentrația lor crește în infecții bacteriene și în boli neoplazice.

Dozarea complementului total prin metoda hemolizei 50% (CH₅₀)

Indicații: Dozările în serul sangvin sunt utile în diagnosticul unor boli prin mecanisme de sensibilizare fie citolitic-citotoxic (unele anemii hemolitice etc.), fie prin complexe imune circulante (glomerulonefrite). Dozarea în exsudatul articular poate diferenția artritele reumatoide de cele infecțioase.

Principiu: Complementul de om activat în reacția cu serul de antiematii de berbec determină, prin complexul de atac C5b6-9, liza hematiilor de berbec. Procentul hemolizei în funcție de creșterea cantității de complement se exprimă printr-o curbă doză—efect care, conform ecuației lui von Krogh, are formă de «S» și, de manieră generală, între 30 și 70% hemoliză evoluează exponențial, încât determinarea punctului 50% este supusă unor erori minime.

Proba: Sângele prelevat prin venipunctură se lasă timp de 30 minute la temperatura camerei în tubul înclinat la cca 20° pentru coagulare. Se desprinde cheagul de pe pereții tubului și se centrifughează pentru separarea serului care se conservă la +4°C, când se lucrează în aceeași zi, sau la -25°C, când testarea se temporizează pentru zilele următoare. Decongelarea tuburilor se va face brusc la curent de apă sau prin agitare în baie de apă la 37°C.

Amănuntele privind prepararea reactivilor necesari și amănuntele tehnice ale procedurii depășesc obiectivele acestui manual.

Necesar, enumerare:

1. Hematii de berbec.
2. Ser hemolitic (ser de iepure imunizat cu hematii de oaie).
3. Complement de cobai (amestec de seruri de la cobai masculi, adulți, normali).
4. Diluent, tampon veronal cu pH 7,3.

Procedura, în rezumat (tabelul 10.2): În tuburi de hemoliză (12/120 mm), peste volume determinate din diluțiile duble ale serului de testat se adaugă volume determinate din *suspensia standardizată a hematiilor de berbec sensibilizate cu o anumită diluție a serului hemolitic*. După omogenizarea conținutului, tuburile sunt incubate timp de 30 minute la 37°C în baie de apă, după care sunt răcite brusc la +4°C, pentru stoparea hemolizei, și centrifugate 3 minute la 3000 rpm. Procentul hemolizei este apreciat spectrofotometric în supernatantul fiecărui tub. Cu valorile obținute se trasează curba procesului hemolitic față de concentrațiile de ser (figura 10.3).

Tabelul 10.2. Dozarea complementului prin metoda hemolizei de 50%, schema de pipetare a reactivilor (vezi și textul)

Diluția inițială a serului	Ser diluat 1:40				Ser diluat 1:10					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Numărul tubului										
Diluent, ml	1,25	1,20	1,10	1,00	1,30	1,25	1,20	1,10	1,00	0,70
Ser de bolnav, ml diluție	0,25	0,30	0,40	0,50	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,80
Cuplu hemolitic ¹ , ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

¹ Hematii de berbec sensibilizate cu ser hemolitic antioaie tirat în prezența complementului de cobai

NOTĂ: Complementul de cobai se folosește pentru titrarea serului hemolitic, amănunt tehnic asupra căruia nu insistăm.

Interpretare: Unitatea CH_{50} este cantitatea cea mai mică de ser care lizează 50% din hematiile sistemului hemolitic. Astfel, titrul complementului în unități CH_{50}/ml este obținut din raportul 1 ml/volum de ser care dă hemoliza 50%. Din figura 10.3 se observă că hemoliza de 50% este dată de 0,020 ml ser hipocomplementemic (curba 3); deci titrul complementului în acest ser este: $1/0,020 = 50$ unități.

Valorile normale pentru adulți sunt 120 unități $CH_{50}/ml \pm 20$, iar pentru copii 100 unități $CH_{50} \pm 20$.

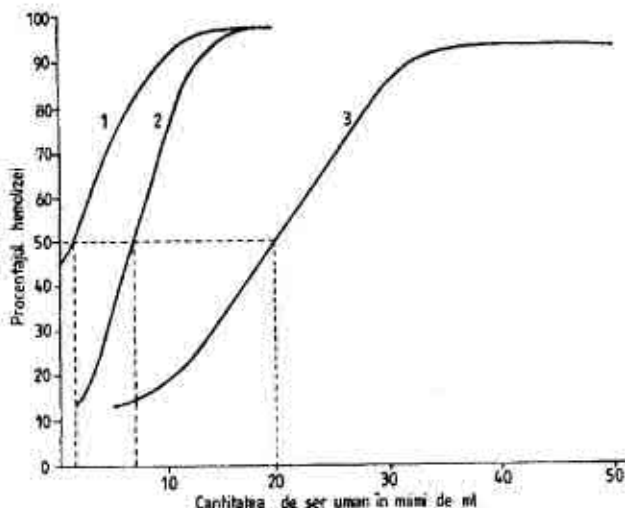


Fig. 10.3. Curba normală și curbe patologice ale complementului, conform titrării activității hemolitice de 50%: 1 — ser hipercomplementemic; 2 — ser normal; 3 — ser hipocomplementemic

10.1.3. Dozarea difuzimetrică a lizozimului în umori

Indicații: Estimarea capacității antibacteriene a urinei, diagnosticul diferențial al leucemiilor acute.

Principiu: Lizozimul difuzează radial într-un gel de agar în care este incorporat *Micrococcus lysodeikticus* (bacterie foarte sensibilă la acțiunea acestei muramidaze) și clarifică mediul opac într-o arie circulară cu diametrul proporțional cu logaritmul concentrației enzimei.

Probă: Ser sangvin sau urină.

Necesar:

1. Tampon fosfat cu pH 6,3.
2. Agar soluție 1%.

Agar	1 g
NaCl	1 g
Tampon fosfat cu pH 6,3	100 ml

Se amestecă, se solvă și se sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 1 atmosferă.

3. Suspensia stock de *Micrococcus lysodeikticus*:

- a) Se suspensionează în soluție salină izotonă sterilă cultura de 48 ore la 37°C a *M. lysodeikticus* pe pante de geloză nutritivă.
- b) Se controlează microscopic puritatea suspensiei (coci grampozitivi).
- c) Se centrifughează suspensia 10 minute la 3000 rpm și se decantează supernatantul.
- d) Se resuspensionează sedimentul în soluție salină izotonă și se centrifughează în aceleași condiții pentru o nouă spălare.

e) Se resuspensionează sedimentul spălat într-un flacon Erlenmeyer cu 20 ml soluție salină izotonă și perle de sticlă.

f) Se adaugă 0,2 ml din soluția 1‰ mertiolat de sodiu și se păstrează suspensia la 4°C.

4. Lizozim p.a. pentru curba de referință.

Procedura:

1. Se prepară soluții de lizozim pur cu concentrațiile: 3; 15; 30; 60 și 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pentru punctele curbei de referință.

2. Se topește gelul de agar 1%.

3. Se diluează suspensia stock de *M. lysodeikticus* cu soluție salină izotonă până la extincția de 0,40 la 650 nm în cuva de 1 cm.

4. Se amestecă:

Agar topit soluție 1%	20 ml
-----------------------	-------

Suspensie bacteriană	3 ml
----------------------	------

Se omogenizează și se toarnă în plăci Petri cu diametrul de 9 cm și fundul perfect plat.

5. Se ștanțează în grosimea stratului de agar 12 godeuri echidistante cu diametrul de 3 mm.

6. Se pipetează în godeuri diluțiile soluției etalon de lizozim și probele de testat.

7. Se incubează 24 ore la temperatura camerei.

8. Se măsoară diametrele zonelor clare de liză din jurul godeurilor.

9. Se trasează curba semilogaritmă de referință, înscriind pe abscisă diametrul zonelor de inhibiție, mm, și pe ordonată \log_{10} al concentrațiilor pentru soluțiile etalon.

10. Se calculează concentrația de lizozim din probă, proiectând succesiv diametrul zonei de inhibiție respective de pe abscisă pe curba de referință și pe ordonată.

Interpretare. Valorile normale ale lizozimului seric: 7—14 $\mu\text{g}/\text{ml}$; urinar: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

10.2. REACȚII SEROLOGICE

10.2.1. Interacțiuni primare și secundare în reacțiile antigen-anticorp

Interacțiuni primare. Situsul de combinare al unui anticorp (paratop) reprezintă amprenta sterică și electrostatică a unui anumit determinant antigenic (epitop). Aceasta

permite ca în amestec cei doi reactanți să se apropie până la numai câțiva Å, distanță la care se pot manifesta forțe intermoleculare generatoare de legături necovalente, cum sunt: legăturile de hidrogen, forțele de atracție electrostatică, forțele van der Waals și legăturile hidrofobe. Legăturile necovalente, deși de zeci de ori mai slabe decât cele covalente, conferă soliditate complexului antigen-anticorp grație multitudinii lor, asigurată prin marea suprafață de contact complementar al celor doi reactivi.

Deci interacțiunea primară antigen-anticorp constă în legarea efectivă a celor doi reactanți.

Interacțiuni secundare urmează cuplării antigen-anticorp și au variate manifestări:

■ *fizico-chimice*: instabilizarea fazei disperse a reactivilor (creșterea greutatea complexului, neutralizarea sarcinilor polare cu reducerea densității lor): precipitarea și aglutinarea;

■ *biologice*: neutralizarea toxinelor, enzimelor, virusurilor, recrutare de noi molecule (complementul) sau celule (fagocite, mastocite) care favorizează eliminarea antigenului complexat.

Reacțiile antigen-anticorp utilizate în laboratorul clinic diferă prin sensibilitatea lor (tabelul 10.3).

Tabelul 10.3. Sensibilitatea reacțiilor antigen-anticorp utilizate în laboratorul clinic, exprimată prin concentrația minimă de anticorpi decelabilă

Reacții și metode	Sensibilitate, $\mu\text{g/ml}$
<i>A. Reacții primare</i>	
Imunofluorescență ¹	10^5-6 UFC sau UFP/ml
ELISA	0,001
RIA	0,001
<i>B. Reacții secundare</i>	
Reacții de precipitare:	
■ precipitare în mediu lichid	10
■ imunodifuzia radială	
— dublă (Ouchterlony)	40
— simplă (Mancini)	10
■ contraimunoelectroforeză	100
Reacții de aglutinare:	
■ aglutinare bacteriană	0,01
■ hemaglutinare pasivă	0,005—0,01
Reacția de fixare a complementului	0,1
Reacții de neutralizare	
■ neutralizarea toxinelor	0,01
■ neutralizarea virusurilor	0,001
¹ Sensibilitatea imunofluorescenței ca metodă microscopică pentru detectarea microorganismelor apreciată în unități formatoare de colonii bacteriene (UFC) sau plaje virale (UFP)	

10.2.2. Aplicații practice ale reacțiilor antigen-anticorp

Aplicațiile practice ale reacțiilor antigen-anticorp se bazează pe *specificitatea cuplării acestor două elemente*, care trebuie verificată prin martori adecvați.

Se pot urmări: *identificarea unui antigen necunoscut prin anticorpii omolog prezente în seruri imune de referință*; *identificarea unui anticorp necunoscut prin antigenul omolog*.

Se pot obține *relații calitative*, simpla identificare a unui reactiv; *relații cantitative*. Diluția maximă a unui reactiv la care mai este vizibilă reacția cu cantități constante și

definite ale reactivului omolog se numește *títuru*; ea caracterizează cantitatea reactivului cercetat și se exprimă printr-o reacție ordinară cu numărătorul 1.

10.2.2.1. Reacții de precipitare

Un antigen solubil formează cu anticorpul omolog un complex insolubil. Reacția poate avea loc în mediu lichid (reacția de precipitare inelară, de floclurare) sau în mediu gelificat (reacții de imunodifuzie, imunoelectroforeza).

Reacția de precipitare inelară. Într-un mic tub, peste un volum de ser imun se pipetează, fără a amesteca cei doi reactivi, un volum din soluția de antigen. Apariția unui precipitat inelar la limita de separare a reactivilor, cu absența acestuia la martorul negativ (ser normal plus soluția de antigen), semnifică un rezultat pozitiv. Reacția de precipitare inelară dă numai rezultate calitative și nu indică numărul sistemelor antigen-anticorp implicate. Se *utilizează* în laboratorul clinic pentru identificarea unor antigeni (polizaharida de grup a streptococilor etc.), în medicina legală pentru identificarea originii petelor de sânge, în controlul alimentelor pentru identificarea originii cărnii.

Reacția de floclurare este utilă când se poate urmări un singur sistem antigen-anticorp. Ca și în reacția de precipitare inelară, reactivii trebuie să fie perfect limpezi. Peste cantități egale de ser imun repartizate într-o serie de tuburi se pipetează cantități crescând din soluția antigenului omolog. Precipitatul format, după omogenizarea conținutului și incubarea tuburilor, este spălat prin centrifugare. Acest precipitat poate fi cuantificat prin diferite metode (dozarea azotului total, dozarea proteinelor). Dacă antigenul conține azot, diferența dintre azotul total și azotul antigen determină cantitatea de azot anticorp. Reacția de floclurare se *utilizează* în special pentru dozarea anatoxinelor.

Imunodifuzia se bazează pe proprietatea antigenului și anticorpului de a difuza într-un gel transparent (agar, agaroză).

Imunodifuzia radială simplă (tehnica Mancini). Antigenul difuzează radial dintr-un godeu în stratul de gel care conține ser imun monospecific. După o perioadă de incubare la 37°C, în jurul godeului cu antigen se formează un halou de precipitat, al cărui diametru este direct proporțional cu concentrația antigenului (figura 10.4). Tehnica Mancini este *folosită* pentru determinarea concentrației proteinelor plasmatice (IgG, IgA, IgM, IgD, proteine ale sistemului complement, proteina C reactivă etc.).

Imunodifuzia dublă radială (tehnica Ouchterlony). Antigenul și anticorpul difuzează radial din godeuri practicate la distanță convenabilă în stratul de gel. După cca 24 ore de incubare, în zona dintre godeuri, unde reactivii corespundenți în difuziune au realizat porții echivalente, apare o linie de precipitare. Tehnica Ouchterlony este *utilizată* pentru caracterizarea antigenilor în amestec (figura 10.5).

Prin **testul Elek** se poate demonstra toxigenza bacilului difteric. Într-o placă Petri cu mediu de cultură adecvat se aplică în lungul unui diametru o bandă din hârtie de

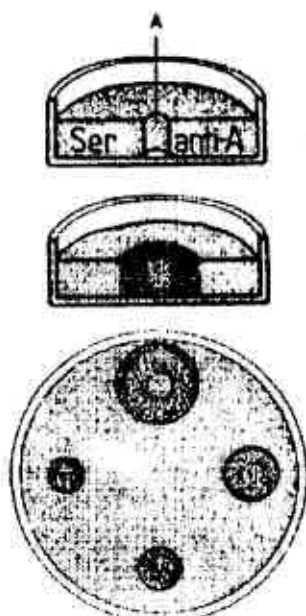


Fig. 10.4. Imunodifuzia radială simplă (testul Mancini). Antiserul A este încorporat în gel. Antigenul omolog A în diluții succesive, este dispus în godeuri. Diametrul haloului de precipitare este proporțional cu concentrațiile antigenului

filtru imbibată cu antitoxină difterică. Perpendicular pe direcția benzii de hârtie se însămânțează, în striu, tulpina de cercetat și câte o tulpină toxigenă și netoxigenă de bacil difteric (respectiv maratorul pozitiv și cel negativ). Plăcile se incubează la 37°C. După 24 și 48 ore se urmărește apariția în unghiul dintre striul de cultură și depozitul de antitoxină a unei linii de precipitare, care continuă cu linia de precipitare toxină-antitoxină a maratorului pozitiv.

Imunoelectroforeza. Prin asociere cu electroforeza puterea de rezoluție a imunodifuziei dublu radiale crește considerabil. Într-un prim timp, amestecul antigenic este supus migrării electroforetice în gel. În al doilea timp, se plasează antiserul într-un șanț paralel cu direcția de migrare electroforetică a antigenilor. În gel se formează arcuri de precipitare cu poziții caracteristice.

Contraimmunoelectroforeza. În gel de agar la pH 8,2—8,6 și când tamponul din gel are forța ionică mai mică decât cea din băile electrozilor, anticorpii au încărcătură electronegativă slabă și sunt antrenați de curentul de electroendosmoză spre catod, iar antigenii, cu sarcină electronegativă mai mare, sunt antrenați în câmpul electric spre anod. Dacă godeul cu anticorpi este dispus spre anod, iar cel cu antigen spre catod, cei doi reactivi se deplasează rapid și în sens contrar, iar unde se întâlnesc în proporții echivalente formează o linie de precipitare (figura 10.6). Lectura se poate face uzual în 30—60 minute. Contraimmunoelectroforeza este folosită pentru depistarea rapidă a antigenilor microbieni în umori.

Reacția de umflare a capsulei este o formă particulară a precipitării: când un ser anticapsular este amestecat pe o lamă de microscop cu microbul care conține polizaharida capsulară omoloagă, microscopic, capsula apare mai bine conturată și cu dimensiuni sensibile mai mari. Testul permite identificarea rapidă, direct în prelevate patologice, a bacteriilor capsulate (pneumococi ș. a.).

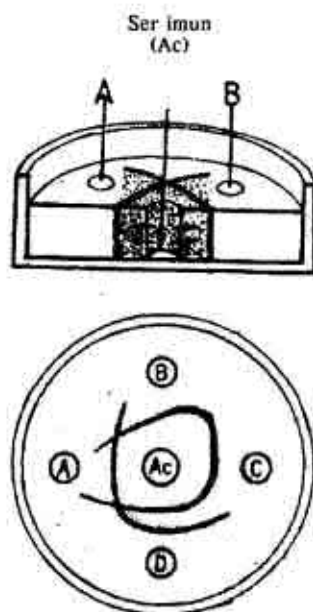


Fig. 10.5. Imunodifuzia dublă radială (testul Ouchterlony). Antiserul este plasat în godeul central, iar antigenul în godeurile periferice

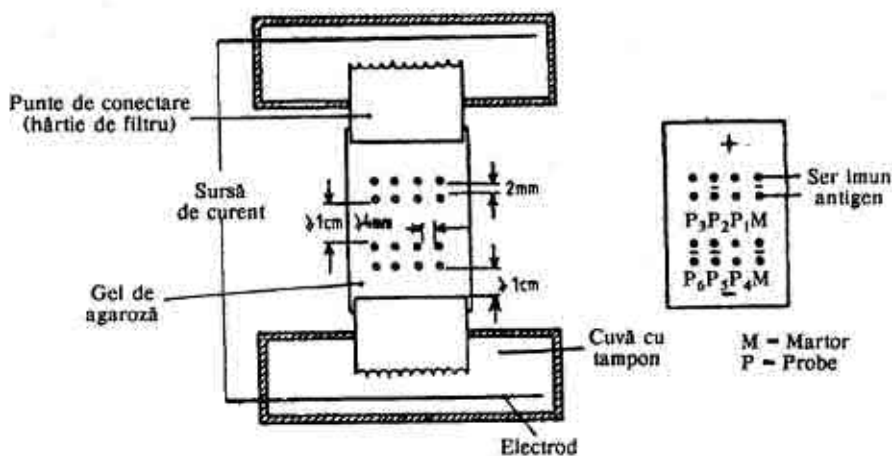


Fig. 10.6. Contraimmunoelectroforeza practică pentru depistarea unui antigen. Probele 2, 5 și 6 conțin antigenul căutat

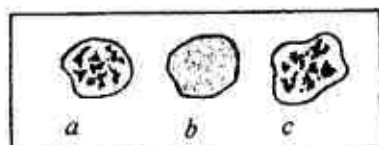


Fig. 10.7. Reacția de aglutinare pe lamă pentru identificarea unei tulpini de *Salmonella*. Suspensia bacteriană aglutinează cu serul polivalent anti-*Salmonella* grup A (a) și cu serul anti-*Salmonella* grup C (c), dar nu și cu serul anti-*Salmonella* grup B (b). Tulpina este deci o *Salmonella* grup C. Absența aglutinării cu serul antigrup B a verificat stabilitatea suspensiei testate

coaglutinare) sau adsorbit pe particule de latex. În aceste cazuri se pot depista antigeni, care, reacționând cu fragmentele Fab ale anticorpului de pe particule vecine, determină aglutinarea.

Reacțiile de aglutinare pot fi efectuate pe lamă când uzual obținem rezultatele calitative, sau în tuburi, când putem realiza cuantificări. Martorii adecvați trebuie să ateste stabilitatea suspensiilor folosite: suspensia antigenică + soluție salină izotonă sau un ser care nu conține anticorpi omologi.

Reacții de aglutinare pe lamă. Aglutinările macroscopice pe lamă, citite după 1—2 minute în oglinda concavă (figura 10.7), se folosesc curent pentru identificarea antigenică a bacteriilor. Sunt mai puțin sensibile decât aglutinările în tub. Aglutinările anumitor microorganisme trebuie urmărite microscopic pe preparate colorate (rickettsiile) sau pe fond negru (leptospirele). Reacțiile de microaglutinare sunt foarte sensibile și se folosesc atât pentru identificarea microbilor, cât și, lucrând cu diluții de ser, pentru cuantificarea anticorpilor.

Latex-aglutinarea și coaglutinarea sunt reacții foarte sensibile larg utilizate pentru depistarea rapidă a antigenilor microbieni în umori.

Reacții de aglutinare în tub (figura 10.8) se folosesc pentru:

- cuantificarea anticorpilor din serul pacienților (serodiagnostic);
- confirmarea rezultatelor aglutinării pe lamă (identitatea microbului aglutinat pe lamă se confirmă dacă serul respectiv îl aglutinează și în tub până la titrul nominal indicat de furnizor — vezi 13.1). Perioada de incubație la 37°C sau 56°C și aspectul aglutinantului diferă cu antigenul: antigen flagelar, incubare 2 ore, aglutinat floconos ușor dissociabil; antigeni somatici, incubare 20 ore, aglutinat grunjos greu dissociabil.

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8	Martor antigen
Diluția	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	
ml antigen	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ml ser de testat	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ml diluent	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Fig. 10.8. Reacția de aglutinare în tuburi pentru depistarea și titrarea anticorpilor din serul unui pacient. Titrul aglutininelor în serul testat este de 1:1280

10.2.2.3. Reacția de fixare a complementului (RFC)

Indicații: Este frecvent utilizată pentru identificarea și titrarea anticorpilor (serodiagnostic), dar poate fi aplicată și la identificarea unor antigeni virali (e. g. identificarea tipului de virus gripal izolat pe embrionul de găină etc.).

Principiu: Reacția se desfășoară în doi timpi:

1. La diluții de ser imun decomplementat (prin încălzire 30 minute la 56°C) se adaugă în cantități determinate antigen și complement, iar amestecul este incubat 18 ore la 4°C pentru formarea complexului antigen-anticorp și fixarea (activarea) complementului.

2. Se adaugă o cantitate determinată de cuplu hemolitic (amestec de hematii de berbec cu ser antihematiei de oaie) care, după incubare 30 minute la 37°C (pentru dezvoltarea hemolizei) și 1—2 ore la 4°C (pentru sedimentarea hematiilor nelizate), testează absența sau prezența complementului în sistem, interpretată după cum urmează:

■ **absența lizei** (hematiile sedimentate în buton cu supernatantul incolor): complementul a fost fixat de complexul imun format în primul timp al reacției; *reacția este pozitivă*;

■ **liza** (amestecul reactivilor limpede, colorat în roșu, fără buton de sedimentare a hematiilor): în primul timp al reacției nu s-a format un complex antigen-anticorp, complementul rămas liber determină liza hematiilor; *reacția este negativă* (fig. 10.9).

În funcție de cantitatea complexului antigen-anticorp fixarea complementului variază și, convențional se notează cu 4; 3; 2; 1 și 0 (respectiv 100; 75; 50; 25 și 0% fixare, adică lipsă de liză).

Proba: În funcție de indicație, ser cu anticorp necunoscut sau suspensie microbiană de identificat.

Necesar:

1. Diluent, tampon veronal cu pH 7,3.
2. Reactivul imunologic de referință, antigen sau anticorp, în funcție de indicația reacției.
3. Hematii de berbec.
4. Ser hemolitic antioaie.
5. Complement de cobai.
6. Plăci standard din material plastic cu godeuri.
7. Pipete automate și semiautomate reglabile pentru volum de 0,1 ml.
8. Eprubete, pipete gradate.

Procedura: Amănuntele complexe privind standardizarea reactivilor depășesc scopul manualului.

Interpretarea corectă a RFC se face după lectura martorilor:

■ **martorul cuplu hemolitic** verifică dacă hematiile nu lizează spontan (sursă de rezultat fals negativ);

■ **martorul complement** verifică dacă în reacție sunt prezente cele 2,5 DH₅₀ indicate uzual;

■ **martorul antigen** verifică dacă antigenul nu fixează complementul în absența anticorpului;

		Reacție pozitivă	Reacție negativă
PRIMA REACȚIE	Ser imun (anticorp)	+	-
	Antigen microbial	+	+
	Complement	+	-
A DOUA REACȚIE	Hematii de oaie	+	+
	Ser hemolitic antioaie	+	+
		Absența hemolizei	Hemoliză

Fig. 10.9. Reacția de fixare a complementului, schema de principiu

■ *martorul ser pozitiv* verifică dacă în reacție a fost utilizată doza precisă de antigen; acest martor trebuie să reproducă titrul cunoscut al serului pozitiv;

■ *martorul ser negativ*;

■ *martorul ser de investigat*.

Un ser care în absența antigenului fixează complementul se numește *anticomplementar*. Cauzele anticomplementarității unui ser pot fi preexistente recoltării (complexe antigen-anticorp circulante) sau țin de recoltarea și conservarea defectuoasă a serului (seruri contaminate în care microbii de contaminare activează complementul).

10.2.2.4. Reacții de neutralizare și reacții de inhibare

Ca și RFC, sunt modalități indirecte de depistare și cuantificare a reacției antigen-anticorp. În esență în aceste reacții sunt implicate antigeni virali sau toxine a căror legare de receptori celulari specifici este urmată de efecte definite (infecție virală, hemaglutinare, hemadsorbție, hemoliză, intoxicație etc.). Anticorpii omologi previn fixarea acestor antigeni pe receptorii celulari. Sistemele indicator în aceste reacții variază cu natura și cu efectele antigenului:

În *reacțiile de neutralizare* se urmărește supraviețuirea animalelor receptive după inocularea amestecului ser imun—virus sau ser imun—toxină și blocarea efectului citopatic după inocularea amestecului în culturi de celule. O variantă a reacției de neutralizare este *testul de seroprotecție*, în care se urmărește capacitatea unei antitoxine, inoculate în prealabil la un animal receptiv, de a preveni efectele specifice ale unei toxine.

Frecvent folosită în laboratorul clinic este *dozarea antistreptolizinei O* bazată pe neutralizarea efectului hemolitic al streptolizinei O, o citotoxină produsă de streptococii grup A, C și G.

Prin *teste intradermice* poate fi urmărită neutralizarea toxinelor difterice, cu efect dermonecrotic (testul Schick) sau a eritrotoxinei streptococice (testul Dick).

Reacțiile de inhibare a hemaglutinării (RIHA) sunt uzual folosite pentru identificarea virusurilor hemaglutinante și în serodiagnosticul infecțiilor determinate de asemenea virusuri. În condițiile necesare hemaglutinării (pH, temperatură), peste diluțiile de ser se adaugă o doză determinată de hemaglutinină și suspensia de hematii. RIHA trebuie însoțită de martori care să ateste: lipsa în serul testat a inhibitorilor nespecifici ai hemaglutinării, a izo- și heteroaglutininelor, sedimentarea hematiilor în buton.

Reacția pozitivă: în prezența anticorpilor inhibitori omologi hemaglutininei, hematiile sedimentează în buton. *Reacția negativă*: în absența acestor anticorpi, hematiile aglutinează în pelicula care tapisează fundul godeului sau al tubului. În funcție de cantitatea complexului anticorp—hemaglutinină, inhibarea variază și, convențional, se notează cu 4; 3; 2; 1 și 0 (respectiv 100; 75; 50; 25 și 0% inhibare) (figura 10.10).

10.2.2.5. Reacții cu anticorpi sau antigeni marcați

Imunofluorescența. Coloranți fluorescenți (izotiocianatul de fluorescență, rodamină) pot fi legați covalent la imunoglobuline. Dacă excesul de colorant este îndepărtat din soluție, se obțin anticorpi marcați fluorescent (imunoconjugate) prin care pot fi identificați și localizați variați antigeni pe frotiuri examinate la microscopul cu radiații ultraviolete (figura 10.11).

Tehnica directă folosește anticorpi marcați specific pentru fiecare antigen. Numărul mare de imunoconjugate necesare face restrictivă utilizarea acestei tehnici.

Tehnica indirectă folosește anticorpi marcați antiimunoglobuline, condiție în care elementele de identificat pot fi atât antigenii, cât și anticorpii. Pentru laboratorul clinic

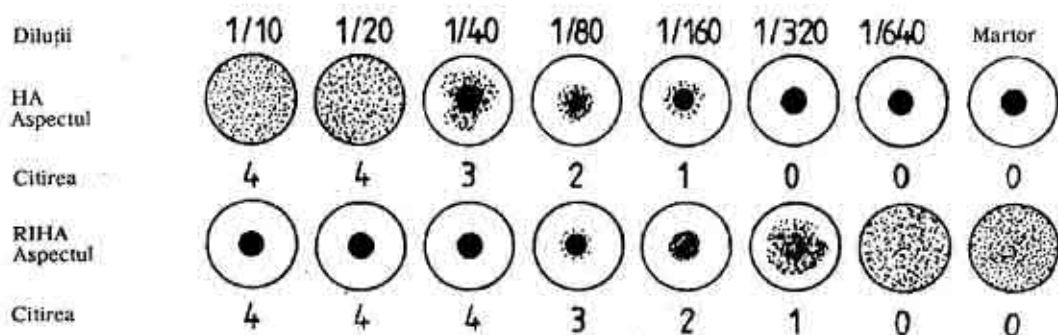


Fig. 10.10. Reacția de hemaglutinare și de inhibare a hemaglutinării în gripă

avantajele metodei indirecte sunt triple: numărul limitat de imunoconjugate necesare; utilitatea și în serodiagnosticul unor boli infecțioase, sensibilitatea mai mare.

Radioimunodozarea (RIA). Antigenii pot fi marcați cu izotopi radioactivi (^3H , ^{125}I , ^{14}C). Există o competiție specifică pentru anticorp între o cantitate cunoscută de antigen marcat radioactiv și antigenul nemarcat (în calitate necunoscută). Se măsoară radioactivitatea complexului antigen-anticorp. Pentru aceasta, fie anticorpul este în prealabil fixat pe un suport insolubil, fie complexul este precipitat cu ser antiimunoglobulină. Concentrația antigenului nemarcat se află comparând radioactivitatea complexului cu o curbă standard. RIA este cea mai sensibilă metodă de cuantificare a antigenilor și haptanelor. În laboratorul clinic este utilizată pentru dozarea hormonilor, medicamentelor, antigenului HBs.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Unul din reactivi, antigenul sau anticorpul, este fixat prin adsorbție pe o suprafață de polistiren (e. g. godeul unei plăci din polistiren). Un anticorp corespunzător este marcat prin conjugare cu o enzimă ca peroxidaza din hrean sau fosfataza alcalină. După formarea complexului cu antigenul și spălarea reactivului necuplat, activitatea enzimatică restantă pe suprafață, care atestă reacția antigen-anticorp urmărită, este testată prin adăugarea substratului cromogen al enzimei de marcare, iar reacția stopată după 30 minute. Culoarea dezvoltată este măsurată spectrofotometric, iar cantitatea reactivului depistat este apreciată în raport cu o valoare prag a densității optice (*cut-off*) sau în EIU (*Enzyme Immunoassay Units*).

Avantajele testelor ELISA sunt două: sensibilitate de același ordin cu RIA și accesibilitate mai mare pentru laboratoarele clinice.

Există trei tipuri de metode ELISA: indirectă, competitivă și cu dublu *sandwich*.

■ **Metoda indirectă** detectează anticorpul. Antigenul de referință, fixat pe suprafața de polistiren, este incubat cu serul testat, apoi cu anticorpi antiimunoglobulină marcați cu enzimă. După fiecare etapă, reactivii necuplați sunt îndepărtați prin spălarea suportului. În final se adaugă substratul cromogen, iar culoarea dezvoltată în interval de 30 minute este măsurată (figura 10.12, a).

■ **Metoda competitivă** detectează de asemenea anticorpi. Anticorpul din serul testat și anticorpul omolog monoclonal marcat cu peroxidaza din hrean, pipetați în ordinea enunțată, intră în competiție pentru antigenul fixat pe suprafața de polistiren. Anticorpii necuplați sunt îndepărtați prin spălare, apoi este adăugat substratul cromogen pentru testarea enzimei restante pe suprafața de reacție. Intensitatea culorii, măsurată după stoparea reacției la 30 minute, deci activitatea enzimei de marcare este invers proporțională cu concentrația anticorpului din serul pacientului testat (figura 10.12, b).

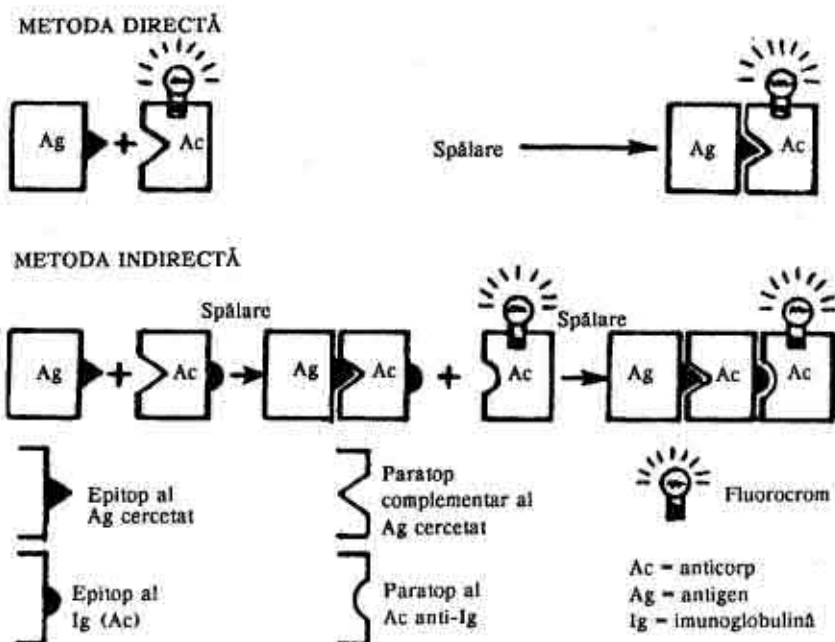


Fig. 10.11. Principiul colorăției imunofluorescente

■ *Metoda cu dublu sandwich* detectează antigenul. Anticorpul de referință fixat pe suprafața de polistiren este incubat, pe rând, cu materialul suspect a conține antigenul, apoi cu anticorpul de referință marcat cu enzimă. După fiecare etapă reacției necuplați sunt îndepărtați prin spălarea suportului. În final este adăugat substratul cromogen și măsurată culoarea dezvoltată în intervalul de 30 minute (figura 10.12, c).

10.2.3. Depistarea imunodeficiențelor umorale: hipo- și agamaglobulinemia

Se testează cantitativ gamaglobulinele (e. g. electroforetic). Nivelul de 2 g% este considerat limita normală inferioară. Prin testul Mancini se pot cuantifica diferențiat clasele de imunoglobuline. Capacitatea de a elabora un răspuns imun umoral poate fi investigată prin:

- căutarea unor anticorpi naturali ubiquitari cum sunt izohemaglutininele A, B; heteroanticorpii față de globulele roșii de oaie, anticorpii bactericizi anti-*E. coli*;
- testarea răspunsului imun față de o anatoxină (difterică, tetanică) sau față de un vaccin corpuscular omorât (niciodată viu atenuat).

10.3. REACȚIILE IMUNITĂȚII CELULARE

Numărul în creștere al persoanelor cu defecte ale imunității mediate celular — unele congenitale (aplazia timică — sindromul Di George, displazia timică — sindromul Nezelof

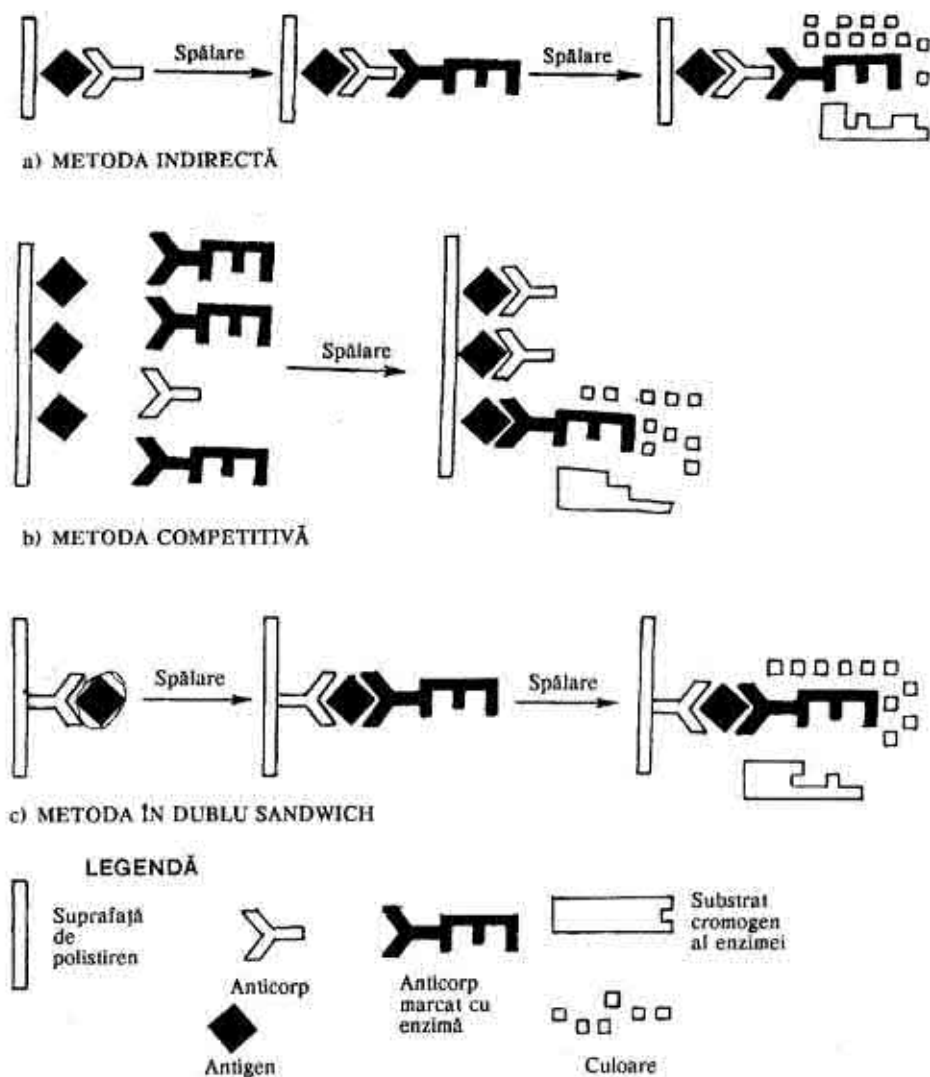


Fig. 10.12. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

etc.), altele dobândite (infecții cu virusuri limfotrope, tumori ale sistemului limfoid etc.) sau induse iatrogen (medicație antitumorală, imunosupresivă, corticoterapie) — explică interesul pentru testarea reactivității mediate celular. Pentru aceasta putem recurge la testări *in vivo* sau *in vitro*.

10.3.1. Testări *in vivo*

10.3.1.1. Intradermoreacții (I.d.r.)

Ca urmare a colonizărilor și frecvențelor infecții, aparente sau inaparente, cu microorganisme ubicuitare, majoritatea persoanelor normale răspund cu reacții de sen-

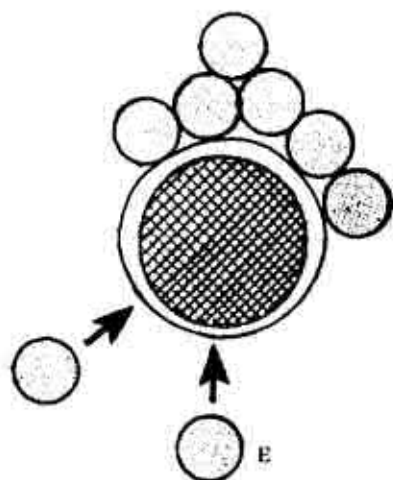


Fig. 10.13. Rozetarea limfocitelor umane cu hematii de oaie, care este o metodă simplă pentru identificarea limfocitelor T, dar fără posibilitatea diferențierii subpopulațiilor

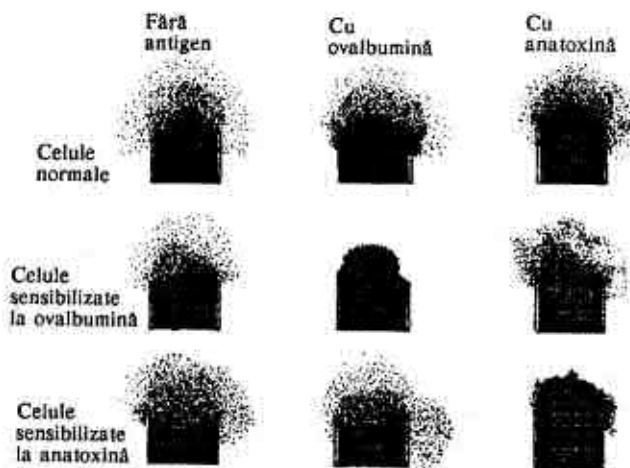


Fig. 10.14. Testul de inhibare a migrării macrofagelor

sibilizare de tip întârziat (vezi fig. 11.1) la injectarea intradermică a antigenilor de *Candida* (candidină), *Streptococcus pyogenes* (streptolizină O, streptokinază-streptodornază) sau *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculină) etc. (vezi 11.1). Răspunsul negativ la testul i.d.r. cu antigenii acestor microbi indică o deficiență a reactivității imune mediată celular.

10.3.1.2. Teste de inducere a sensibilității întârziate

Pe tegument se aplică în spot soluția 1% de dinitrocloro- sau dinitrofluorobenzen capabilă să inducă sensibilizare mediată celular. După 24 ore tegumentul este spălat, iar după 7—14 zile, exact în aceeași arie se aplică o picătură de soluție 0,03—0,1% a aceluiași derivat. Competența de a elabora un răspuns imun celular se traduce prin apariția unui infiltrat inflamator în aria cutanată testată.

10.3.2. Testări *in vitro*

10.3.2.1. Număratoarea diferențiată a limfocitelor

Tehnologia modernă permite obținerea de anticorpi monoclonali de șoarece specifici pentru variați markeri limfocitari de suprafață: variatele clase de imunoglobuline ale limfocitelor B, markerii CD₄ ai limfocitelor T ajutătoare (T_H), CD₈ ai limfocitelor T supresor (T_S) sau markeri ai altor celule. Acești valoroși reactivi permit număratoarea diferențiată a populațiilor și subpopulațiilor limfocitare prin două metode: *imunofluorescență* și *citometria în flux (flow cytometry)*. În acest mod pot fi stabilite deficitele congenitale de sinteză a unei anumite clase de imunoglobuline, raportul subpopulațiilor limfocitare CD₄ ajutătoare/CD₈ supresoare, care normal este de 1,5, dar ajunge sub 1 la pacienții cu deficite imunitare (e. g. SIDA).

Laboratoarele fără acces la aceste tehnici moderne pot recurge la o tehnică mult mai modestă: *rozetarea limfocitelor T cu hematiile de oaie*. Rozeta este o grupare celulară experimentală, identificabilă microscopic, formată dintr-o celulă (celula formatoare de rozetă) pe suprafața căreia se leagă cel puțin 3 celule de un singur tip (celule indicatoare). Limfocitele T umane formează spontan rozete cu hematiile de oaie. Suspensia de limfocite umane, separată prin centrifugare în gradient de densitate, este incubată în prezența hematiilor de oaie. Celulele resuspensionate sunt examinate apoi microscopic pentru identificarea și cuantificarea rozetelor (figura 10.13). Normal proporția limfocitelor din sângele periferic uman care rozetează cu eritrocite de oaie este de 70%.

Transformarea blastică a limfocitelor. Sub acțiunea unui mitogen limfocitele se transformă în celule mari blastice, care se divid activ. Fenomenul poate fi cuantificat prin determinarea microscopică a numărului și proporției de celule blastice apărute într-o populație de limfocite sau prin măsurarea cantității de timidină tritiată incorporată de ADN. Prin acest test se poate aprecia:

- reactivitatea globală a limfocitelor T, dacă se utilizează un mitogen policlonal ca fitohemaglutinina sau concanavalina A;
- reactivitatea unei clone limfocitare la un antigen dat.

Inhibiția migrării macrofagelor. Limfocitele specific sensibilizate cultivate în prezența antigenului omolog eliberează factorul de inhibiție a migrării macrofagelor (MIF), care inhibă migrarea macrofagelor dintr-un tub capilar introdus în camera de cultivare (figura 10.14).

ALERGENII ȘI METODA ALERGOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

Apărarea specifică a organismului față de agresiunea antigenică se desfășoară în două faze: la *primul contact* apar semne ale acțiunii directe a antigenului (toxină, venin etc.) sau nu apar semne vizibile dacă antigenul este lipsit de o asemenea acțiune (seruri heteroloage ș. a.); la *al doilea contact* organismul prezintă o stare de rezistență specifică la acțiunea nocivă directă a antigenului, «imunitate», sau o stare de sensibilitate crescută, «sensibilizare».

În 1906 von Pirquet numea această modificare a reacțiilor organismului după contact repetat cu antigeni «alergie» (gr. *allos* = alt și *ergein* = a acționa, deci altă reacție). Progresiv, prin uz, semnificația termenului de alergie s-a restrâns, el devenind, în limbajul medical contemporan, sinonim cu sensibilizare.

Imunitatea și sensibilizarea sunt două modalități de manifestare ale unui fenomen unic: reacția aceluiași antigen cu efectorii imunitari. Imunitatea și manifestările sensibilizării față de un antigen depind de:

- raporturile cantitative realizate între antigen și anticorpii omologi;
- tipul efectorilor implicați;
- sediul reacției antigen-anticorp.

R. A. Coombs și P. G. Gell au clasificat sensibilizările, după mecanismul de producere, în patru tipuri:

- *tipul I* — reacțiile mediate de anticorpi citofili;
 - *tipul II* — reacțiile citolitic-citotoxice, care sunt mediate de anticorpi față de antigeni de pe suprafața celulelor cu participarea complementului, a celulelor *K* sau macrofagelor;
 - *tipul III* — reacțiile mediate de complexe imune cu participarea complementului;
 - *tipul IV* — reacțiile mediate de limfocitele *T* sensibilizate la antigen (figura 11.1).
- Pentru că reacțiile de tip I—III se manifestă la intervale de minute sau ore după pătrunderea antigenului, se numesc *sensibilizări imediate*, în timp ce reacțiile de tip IV, care se manifestă după 24—48 ore, sunt *sensibilizări întârziate*.

În evoluția unor infecții, efectorii imunitari pot contribui, alături de agentul etiologic, la patogenia bolii. Este cazul sensibilizărilor la antigeni ale agenților infecțioși:

■ Fenomene anafilactice apar în evoluția unor infecții cronicizate ale tractusului respirator inferior (astmul intrinsec), helmintiaze cu fază tisulară (ascaridioză, echinococoză etc.).

■ Reacții citolitic-citotoxice determină leziunile de hepatită cronică în infecția persistentă cu virusul hepatitei B sau C.

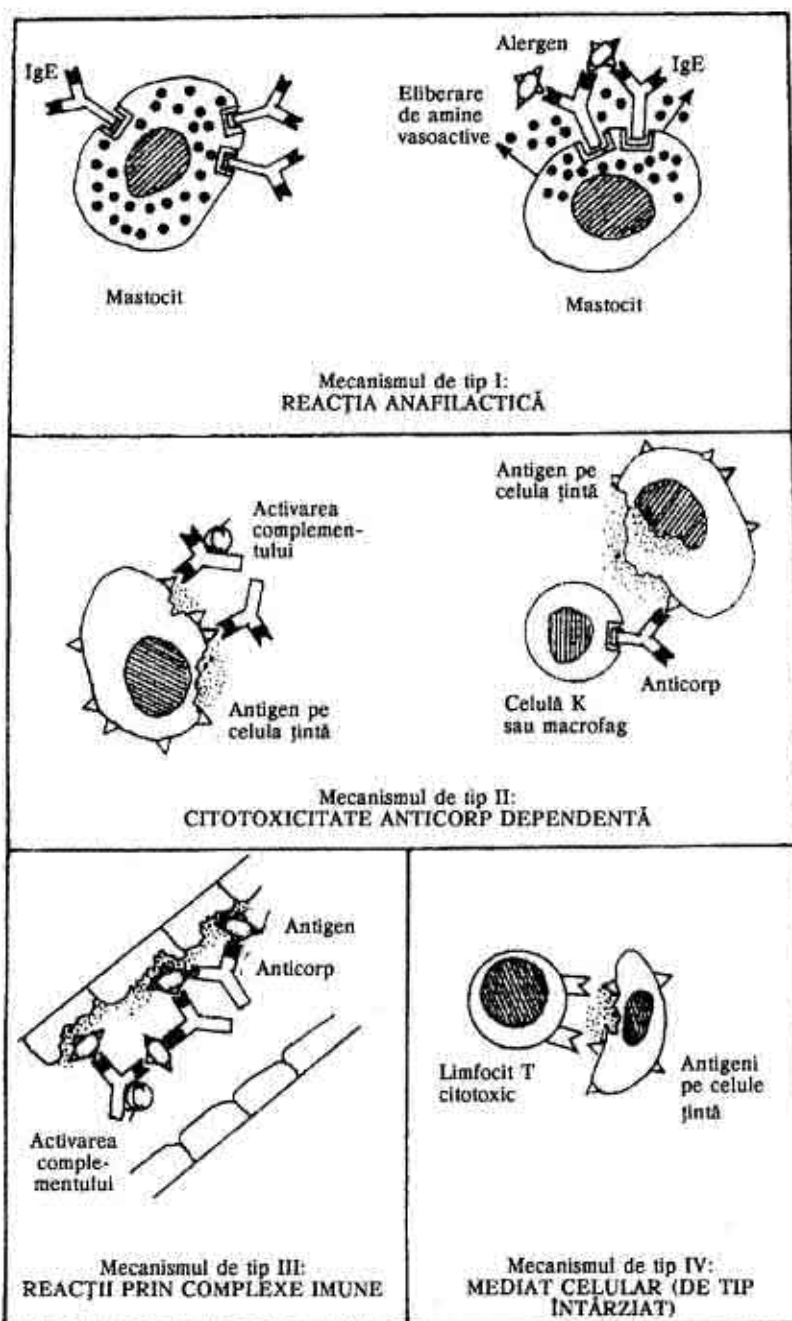


Fig. 11.1. Reprezentare schematică a celor patru tipuri de sensibilizare stabilite de R. A. Coombs și P. G. Gell

■ Reacții localizate prin complexe antigen-anticorp se întâlnesc în aspergiloza pulmonară (infecția cu *Aspergillus fumigatus* a persoanelor sensibilizate prin inhalare repetată de pulberi conținând sporii acestui fung).

■ Leziunile de glomerulo-nefrită care apar la pacienții cu endocardită bacteriană subacută sau după 2—3 săptămâni de la debutul infecției cu anumite serotipuri de *Streptococcus pyogenes* sau *S. zooepidemicus* se datorează sensibilizării prin complexe antigen-anticorp circulante. Acești pacienți au complementul seric scăzut, iar colorația imunofluorescentă depistează subendotelial, în lungul membranei bazale glomerulare, depozite de imunoglobuline și C_3 .

■ Sensibilizarea de tip IV apare ca un corolar al imunității când în organism pătrunde ori s-a format în cantități mari antigenul sensibilizant în infecții cu microorganisme intracelulare.

Sensibilizările la variații alergeni din mediul extern (tabelul 11.1) este o temă relativ mare, dar în acest capitol vom trata cu precădere metodele și tehnicile de depistare a sensibilizărilor la antigeni ale unor agenți infecțioși cu rol semnificativ pentru diagnosticul infecțiilor determinate și, eventual, în patogenia bolilor respective. Putem recurge la teste *in vivo* sau la testări *in vitro*.

Tabelul 11.1. Teste intradermice de sensibilizare la unii agenți infecțioși sau alți alergeni cu interes pentru patologia infecțioasă

Antigen	Diluții doze, ml	Citirea după	Diagnostic	Observații
<i>Diagnosticul infecției</i>				
Brucelină ¹	0,1	24—48 ore	Bruceloză	Papulă cu diametrul ≥ 10 mm absentă la martorul cu vehiculul antigenului
Frei ²	0,1	48—72 ore	Linfogranulomatoză veneriană	Papulă cu diametrul ≥ 6 mm absentă la martorul cu vehiculul antigenului. Apare pozitivă și în alte infecții cu <i>Chlamydia trachomatis</i>
Limforeticuloză benignă de inoculare ³	0,1	24—48 ore	Boala zgârieturii de pisică	Papulă cu diametrul ≥ 6 mm
Rickettsian ⁴	0,1	24—48 ore	Febră Q Tifos exantematic Febre pătate Tifos de lăstăriș	Papulă cu diametrul ≥ 5 mm absentă la martorul cu vehiculul antigenului

Tabelul 11.1 (continuare)

Antigen	Diluții doze, ml	Citirea după	Diagnostic	Observații
Tuberculină (PPD ⁵)	2 U/0,1 10 U/0,1	48—72 ore	Tuberculoză (infecție latentă sau boală)	Papulă cu diametrul ≥10 mm
Tularină ⁶	0,1	48—72 ore	Tularemie	Papulă cu diametrul ≥10 mm; posibil vezicule în centrul leziunii. Martor cu vehicolul antigenului
Toxoplasmină ⁷	01	24—48 ore	Toxoplasmoză	Papulă cu diametrul ≥10 mm; posibil veziculă centra- lă. Martor cu vehicolul antigenului
Casoni ⁸	0,2	Reacție precoce: 10—20 minute Reacție tardivă: 24 ore	Hidatidoză: chist nefisurat, imunoselectiv Chist fisurat, imunoactiv	Papulă cu diametrul ≥10 mm. Martor cu vehicolul an- tigenului. Sen- sibilitate: 75%; specificitate: 90%
Trichinian ⁹	10 ⁻⁴ /0,1	Reacție precoce: 5—20 minute Reacție tardivă: 18—24 ore	Trichineloză	Papulă cu diametrul ≥10 mm. Martor cu vehicolul antigenului
Coccidioidină ¹⁰ Sferulină ¹¹	10 ⁻⁴ —10 ⁻² /0,1	24—48 ore	Coccidioido- micoză	Papulă cu diametrul ≥ 5 mm. Martor cu vehicolul antigenului
Histoplasmină ¹²	0,1	48—72 ore	Histoplasmoză	Papulă cu diametrul ≥5 mm. Martor cu vehicolul antigenului
<i>Aspergillus</i> sp. și alte mucegaiuri ¹³	10 ⁻⁴ —10 ⁻³ /0,1	10—20 minute 4 ore	Sensibilizări atopice (astm bronșic) Aspergiloză bron- hopulmonară	Papulă cu diametrul ≥5 mm. Martor cu vehicolul antigenului
<i>Medicamente</i>				
Seruri hiperimune heterologe	10 ⁻³ —10 ⁻² /0,1	5—30 minute	Sensibilizare anafilactică	Papulă urticariană sau numai eritem cu diametrul ≥5 mm

Antigen	Diluții doze, ml	Citirea după	Diagnostic	Observații
Penicilină G potasică	50—1000 UI/ml ¹⁴ 10 ⁴ UI/ml 0,1	15 minute	Sensibilizare anafilactică	Se începe cu testul percutan ¹⁶ ; dacă ră- mâne negativ, se continuă la intervale de 15 minute cu i. d. r. începând cu cea mai mică doză recomandată. Papulă urticariană sau numai congestie cu diametrul ≥5 mm

Evaluarea imunității mediate celular

Candidină ¹⁷	10 ⁻⁴ —10 ⁻¹ /0,1	24—48 ore	—	Papulă cu diametrul ≥5 mm: prezintă capacitatea de a elabora un răspuns imun celular. Mar- tor cu vehicolul an- tigenului
Antigen urlian ¹⁸	0,1	24—48 ore	—	Ibidem
Streptokinază-strep- todornază ¹⁹	0,1	24—48 ore	—	Ibidem

¹ Brucelină: Filtrat al culturii de *Brucella*, fază S, în vârstă de 25 zile. Nu este imunogen, ci numai reactogen. În caz de rezultat neconcludent, testul se poate repeta numai după 30 zile pentru a evita desensibilizări.

² Extract inactivat termic din celulele sacului vitelin al embrionului de găină infectat cu *Chlamydia trachomatis*, serotipurile L₁-L₃; poate provoca seroconversie; are înrudiri cu celelalte serotipuri de *C. trachomatis*.

³ Puroi din leziunile unui caz tipic; aspirat aseptice și inactivat termic.

⁴ Antigen rickettsian solubil (specific de grup) sau corpuscular (specific de specie) obținut din sacul vitelin al embrionului de găină infectat.

⁵ *Tuberculina clasică*: filtratul culturii în bulion glicerinat al bacililor tuberculozei, omorâți prin căldură, concentrat prin evaporare în baie de apă la 80°C până la 1/10 din volumul inițial. Elementul activ sunt tuberculoproteinele, care, denaturate prin căldură, își pierd imunogenitatea, dar își păstrează reactivitatea specifică. Se utilizează pentru i.d.r. în diluții de la 10⁻⁶ la 10⁻⁴. PPD (*Purified Proteins Derivative*) este mai stabil, mai specific și mai sensibil decât tuberculina brută și dozat mai precis în unități tuberculice.

- ⁶ *Tularină*: Suspensie cu 10^8 coccobacili tularemici/ml în soluție salină izotonă, glicerinată 3% și inactivată o oră la 80°C .
- ⁷ *Toxoplasmină*: Extract în soluție salină izotonă din trofozoizii de *T. gondii*; poate fi liofilizat.
- ⁸ Lichid hidatic formolat; poate fi liofilizat.
- ⁹ Extract din larve de *Trichinella spiralis*.
- ¹⁰ Filtratul culturii de *Coccidioides immitis* în bulion sintetic.
- ¹¹ Extract din sferule tisulare de *C. immitis*.
- ¹² Filtratul culturii de *Histoplasma capsulatum* în bulion sintetic. Este unul din pușinii antigeni utilizați în i.d.r. care nu-și pierde imunogenitatea și poate determina creșteri ale titrului anticorpilor anti-*Histoplasma* (e. g. anticorpilor fixatori de complement).
- ¹³ Filtratul culturii acestor specii.
- ¹⁴ La pacienți cu antecedente certe de sensibilizare imediată.
- ¹⁵ La pacienți fără antecedente certe de sensibilizare.
- ¹⁶ Testul percutan: Se antisepticizează tegumentul de pe fața anterioară a antebrațului succesiv cu alcool și apoi cu eter pentru a-l usca. Cu un vaccinostil sau cu un ac de seringă se scarifică de 2—3 ori tegumentul pe o lungime de 0,5—1 cm până apare o picătură de limfă ușor sangvinolentă. Se depune pe suprafața scarificată o picătură din soluția de antigen și se urmărește reacția de tip anafilactic.
- ¹⁷ Filtratul culturii de *Candida albicans*.
- ¹⁸ Extract antigenic din embrionul de găină infectat cu virusul parotiditei epidemice.
- ¹⁹ Filtratul culturii de *Streptococcus pyogenes* în bulion.

11.1. TESTĂRI IN VIVO: INTRADERMOREACȚII LA ALERGENI

Principiu: Un alergen inoculat intradermic la o persoană sensibilizată reacționează cu efectorii imunitari preexistenți și determină o inflamație locală în interval de 5—20 minute, de tip anafilactic (implicarea anticorpilor IgE), până la 6 ore, de tip Arthus (implicarea anticorpilor IgG, IgM și complementului), între 24—72 ore sau mai mult de tip tuberculinic (implicarea limfocitelor specific sensibilizate).

Indicații:

- Diagnosticul unor infecții inaparente, latente sau manifeste clinice.
- Depistarea sensibilizării la unele medicamente injectabile ca: seruri hiperimune heterologe, penicilină, novocaină, substanțe iodate pentru contrast radiologic.
- Determinarea capacității unei persoane de a elabora răspuns imun celular.
- Identificarea alergenilor responsabili de anumite stări morbide (astm bronșic, eczeme profesionale ș. a.).

Necesar:

1. Truse cu extracte alergene, mai mult sau mai puțin complete, sunt comercializate de diferite laboratoare ca Institutul Pasteur din Paris, Institutul Cantacuzino din București ș. a. (tabelul 12.1).
2. Seringă Luer de 1 ml, cu gradații de 0,05 ml, prevăzută cu ac 16/5 (lungime de 16 mm, calibru de 0,5 mm).
3. Tamponate din vată sau tifon.
4. Alcool etilic de 70° .

Procedură: Se antiseptizează cu alcool de 70^o tegumentul feței anterioare a antebrațului în 1/3 mijlocie. Se inoculează strict intradermic cantitatea indicată de antigen (tabelul 11.1), uzual 0,1 ml.

Observații: Când pacientul declară în antecedente reacții de tip anafilactic, antigenii care pot induce asemenea reacții vor fi testați mai întâi percutan (vezi nota 16, tabelul 11.1) cu diluția cea mai mare a antigenului, iar testarea nu va fi începută fără trusa de urgență antișoc (adrenalină, hidrocortizon hemisuccinat, romergan) sau antiastmatică (astmofug, bronhodilatin, Alupent spray, Berotec spray etc.).

Citirea:

1. *Reacțiile de tip anafilactic*, apar în interval de 5—20 minute și se manifestă ca o papulă urticariană palidă, înconjurată de o aureolă congestivă cu tegumentul catifelat și pruriginoasă; dispar în interval de 30—60 minute.

2. *Reacțiile de tip III, Arthus*, apar după 4—6 ore ca o papulă infiltrativă, indurată, congestivă împreună cu regiunea înconjurătoare. În caz de reacție intensă centrul leziunii poate lua aspect peteșial, chiar necrotic. Dispar în interval de 24 ore sau mai mult, în funcție de intensitatea leziunii.

3. *Reacțiile de tip IV, întârziate sau de tip tuberculinic*, apar după 24—96 ore, chiar mai mult, în funcție de antigen (tabelul 11.1) ca o papulă infiltrativă, indurată, congestivă împreună cu regiunea înconjurătoare. La reacții intense, în centrul leziunii pot apărea vezicule. Dispar lent în interval de câteva zile.

Aprecierea reacțiilor se face după diametrul papulelor (tabelul 11.1) în condițiile absenței unei asemenea leziuni sau a dispariției ei semnificativ mai precoce la martor (c. g. sensibilizarea de tip anafilactic sau de tip Arthus asociate unei sensibilizări întârziate la antigeni cum sunt candidina, antigenul trichinian).

Interpretarea rezultatelor trebuie diferențiată:

1. *Testele percutane sau i.d.r. pentru sensibilizări de tip imediat:*

a) *Au importanță deosebită pentru identificarea alergenului în boli prin sensibilizări atopice* (astm, edem Quinque etc.), în aspergiloza pulmonară, identificarea sensibilizărilor la unele medicamente.

b) *Pentru diagnosticul unor helmintiaze* (ascaridioză, distosomiace, filarioze, schistosomiază) sau micoze (candidoze) sunt prea puțin sensibile și specifice, încât nu se mai utilizează. Doar în unele servicii, care nu au posibilitatea altor teste, se mai utilizează i.d.r. Căsoni pentru diagnosticul hidatidozei cu o sensibilitate de 75% și o specificitate de 90%.

2. *Testele i.d.r. pentru sensibilizări de tip întârziat:*

a) *În diagnosticul bolilor infecțioase* trebuie interpretate prudent:

Sensibilizarea întârziată poate fi demonstrată numai între 1 și 10 săptămâni după debutul infecției. Intervalul în care apare acest tip de sensibilizare depinde de mai mulți factori ca: agentul infecțios, perioada de incubație a bolii, reactivitatea gazdei și alți factori mai puțin cunoscuți. Cel mai precoce apare în boli ca histoplasmoza, limfogranulomatoza veneriană; în infecția tuberculoasă apare abia după 10 săptămâni, iar în lepra și mai târziu.

Testele intradermice de tip întârziat se pot nega temporar în unele circumstanțe fiziologice (sarcină) sau patologice (convalescența unor viroze anergizante ca gripa, rujeola etc.) și tratamente imunodepresive. Se negativează la pacienții cu SIDA. Nici nu se pozitivază la pacienți cu imunodeficiențe congenitale ale răspunsului imun celular, deși infecțiile cu microorganisme facultativ intracelulare evoluează deosebit de grav la acești pacienți (c. g. lepra lepromatoasă, tuberculoza miliară, histoplasmoza și coccidiomicoza diseminate progresiv).

Sensibilizarea întârziată persistă cât persistă și infecția latentă cu microorganismele respective sau este întreținută prin contacte repetate cu acestea.

Agenti infecțioși ca micetele (e. g. *Histoplasma*, *Coccidioides*), serovarurile de *Chlamydia trachomatis* ș. a. au antigeni comuni.

În aceste condiții i.d.r. devin semnificative pentru diagnosticul unei infecții atunci când:

- Se surprinde virajul de la negativ la pozitiv.

- Se surprinde saltul de la o intensitate la alta a reacției. Așa este «saltul tuberculinic»: creșterea cu peste 8 mm a diametrului reacției între două testări. Dar pentru aceasta sunt necesare testări în dinamică la intervale de 6 luni (testări mai frecvente duc la desensibilizări), care se pot efectua numai în focare de tuberculoză.

- Cum între cantitatea de antigen din organism și intensitatea i.d.r. la o persoană normoreactivă este o relație direct proporțională, se admite că un test intradermic foarte intens indică boala și nu infecția latentă cu agentul infecțios respectiv.

- Dată fiind înrudirea antigenică între unii agenți infecțioși:

- Rezultatele i.d.r. trebuie interpretate în contextul clinic: e. g. antigenul Frei dă i.d.r. pozitivă și la pacienții cu limfogranulomatoză veneriană și la cei cu conjunctivite sau uretrite cu incluziuni;

- Se recurge la testarea cu baterii de antigeni: e. g. testare în puncte diferite cu coccidioidină sau sferulină și histoplasmină.

b) Pentru *diagnosticul areactivității imune celulare* interpretarea rezultatelor i.d.r. la candidină, la antigenul urlian și la streptokinază-streptodornază este mai ușoară.

11.2. TESTE IN VITRO

11.2.1. Testul radioimunosorbentului (RIST)

Acest test dozează cantitatea totală de anticorpi IgE din sânge, așa cum apare crescută în infecțiile determinate de helminți cu fază tisulară sau prevăzuți cu cârlige de fixare pe mucoase. Anticorpii de iepure anti-IgE umană sunt adsorbiți pe particule de Sephadex (un imunoadsorbent) și reacționează cu cantități determinate de ser standard sau de pacient. IgE legată pe imunoadsorbent este măsurată apoi prin adăugare de anti-IgE marcată radioactiv.

11.2.2. Testul radioalergosorbentului (RAST)

Acest test dozează IgE responsabile de sensibilizarea anafilactică față de un anumit alergen (e. g. polen de graminee, mușcăiuri etc.). Alergenul este fixat pe un imunoadsorbent (particule de Sephadex, rondelă de hârtie) care este apoi tratat cu serul pacientului și spălat pentru îndepărtarea IgE necuplate. Cantitatea de IgE specifică alergenului este apoi estimată prin adăugare de anti-IgE umană marcată radioactiv.

11.2.3. Testul Schultz-Dale

Uterul sau un fragment de intestin de la un cobai normal preincubat cu serul unui pacient cu sensibilizare anafilactică este sensibilizat pasiv, prin fixarea IgE, și la adăugarea alergenului specific, în baie de organ, se contractă.

VACCINURILE. AUTOVACCINURI. METODE DE OBTINERE

Vaccinurile sunt produse biologice prin care se obține o *imunizare artificială activă* contra unor boli infecțioase sau toxine microbiene.

Patru calități de bază se cer unui vaccin: eficiență, inocuitate, stabilitate și cost accesibil.

Eficiența vaccinării presupune:

- calități imunogene verificate ale vaccinului;
- capacitatea organismului vaccinat de a elabora răspuns imun;
- un interval de timp suficient pentru apariția anticorpilor protectori și formarea clonului limfocitar cu memorie, care, la un nou contact cu antigenul, să realizeze expansiunea rapidă caracteristică răspunsului imun secundar.

Inocuitatea. Un vaccin trebuie să fie inofensiv, să nu producă suferințe persoanelor vaccinate. Suferințe postvaccinale pot fi acceptate numai dacă acestea sunt minime sau apar cu frecvență semnificativ mai redusă decât cele individuale sau colective, produse prin evoluția naturală, spontană, a bolii infecțioase respective. Prin urmare, inocuitatea se apreciază sub *raport risc—beneficiu*.

Stabilitatea pe durata preparare—administrare este esențială mai ales pentru vaccinurile vii atenuate, care impun un lanț de facilități frigorifice atunci când distanțele dintre producător și unitățile în care se administrează vaccinul sunt mari.

Costul vaccinului este un aspect foarte dificil, mai ales pentru țările care dispun de bugete limitate pentru sănătatea publică. Administrarea individuală sau generalizată a unui vaccin trebuie apreciată în *termeni de cost—eficiență*. Pentru vaccinările generalizate trebuie să dispunem de vaccinuri cât mai ieftine. O vaccinare care costă 80 \$, cum este cea contra hepatitei B, rămâne prohibitivă pentru multe țări și se aplică numai selectiv sau electiv, chiar și în țările bogate.

12.1. TIPURI DE VACCINURI

12.1.1. Vaccinurile vii atenuate

Vaccinurile vii atenuate sunt tulpini microbiene selectate pentru capacitatea lor imunogenă în condițiile unui nivel redus și stabil al virulenței.

Metodele de atenuare a virulenței:

1. *Metode clasice:*

- *Vaccinuri heterologe.* Un excelent asemenea vaccin a fost virusul vaccinal (agentul vaccinei vacilor) folosit ca vaccin antivariolic până la eradicarea acestei boli.

■ *Modificarea condițiilor de creștere a unui microorganism.* Primele vaccinuri atenuate antibacteriene au fost preparate de Louis Pasteur prin cultivarea bacilului holerei găinilor și a bacteridiei cărbunoase la temperaturi mai mari decât temperatura optimă de creștere. A. Calmette și C. Guérin au atenuat complet virulența unei tulpini de *Mycobacterium bovis* după 230 repicări neîntrerupte, timp de 13 ani, începând din 1908, pe mediul cu cartofi biliși glicerinat 5%. Această tulpină atenuată sub acțiunea bilei, numită BCG (bacilul lui Calmette și Guérin) este actualul vaccin antituberculos. Prin selecție după mutagenză chimică a fost obținută o tulpină atenuată de *Salmonella typhi* utilizată ca vaccin viu.

Virusologii au recurs la două metode principale de selecție a mutațiilor virali atenuați: pasaje seriate în culturi de celule *in vitro* și adaptarea la temperaturi mai mici decât temperatura optimă de cultivare.

Prin pasaje seriate în culturi de celule au fost atenuate tulpinile virusurilor: poliomieltic, rujeolic, rubeolic, al parotiditei epidemice, al febrei galbene și al hepatitei A, care se folosesc astăzi ca vaccinuri.

Adaptarea la rece este în fond selecția mutațiilor de virus gripal sau a altor virusuri respiratorii capabile să cultive la 25°C. Asemenea tulpini de virus gripal pot fi utilizate ca vaccin pentru că sunt replicate la temperaturi sub 32—34°C, temperatura căilor respiratorii superioare, dar nu infectează căile respiratorii inferioare unde sunt 37°C.

2. *Metodele moderne* sunt aplicate în fază experimentală.

■ Unele folosesc *ingineria genetică* pentru a forma recombinanți ai virusului vaccinal cu gene care codifică glicoproteine de înveliș viral (e. g. hemaglutinina virusului gripal).

■ Altele urmăresc *mutanți cu deleția principalei gene de patogenitate* (e. g. mutant de poliovirus tip 2 cu o singură bază modificată, mutant de *Vibrio cholerae* cu pierderea genelor care codifică polipeptida A a toxinei).

Avantajele vaccinurilor vii atenuate. La persoanele normoreactive produc o infecție inaparentă cu multiplicarea tulpinii vaccinate în organele și țesuturile țintă (epiteliul respirator, intestin etc.) sau cu inducerea unei infecții latente. De aceea vaccinurile atenuate produc, în general, după o singură inoculare, o imunitate eficientă (constituirea barierei imune prin stimularea anticorpilor IgA secretori, stimularea eficientă a imunității celulare) și de durată.

Efectul vaccinării poate fi amplificat prin pasajul tulpinii vaccinante între membrii colectivității (e. g. vaccinurile administrate pe cale orală sau prin inhalare).

Prin toate aceste calități vaccinurile vii atenuate sunt mai ieftine decât cele inactivate.

Dezavantajele vaccinurilor vii atenuate:

■ *Mutația reversă* la forma virulentă. Poate fi exclusă dacă tulpina vaccinată a fost atenuată prin mai multe mutații.

■ *Riscul encefalitei* după vaccinarea antirujeolică este evident mai redus decât după infecția naturală.

■ *Riscul bolii infecțioase* postvaccinale este controlat prin respectarea contraindicațiilor particulare vaccinurilor atenuate (vezi mai jos).

12.1.2. Vaccinurile omorâte

Vaccinurile omorâte sunt suspensii microbiene inactivate prin agenți chimici (β -propiolactonă, formaldehidă, fenol și acetonă) sau prin căldură. Fiind omorâte, elimină riscul infecției postvaccinale. Au însă dezavantajul imunogenității mai reduse, care impune injectarea mai multor doze.

12.1.3. Vaccinurile cu componente microbiene purificate

Anatoxinele (toxozii) sunt toxine proteice care, prin tratare cu formol la cald, pierd toxicitatea, dar își păstrează imunogenitatea (e. g. anatoxina tetanică, difterică etc.).

Polizaharidele capsulare bacteriene (e. g. pneumococi, meningococi, *Haemophilus influenzae* tip b), *lipopolizaharidul* bacililor gramnegativi, *antigenul de suprafață* al virusului hepatitei B (AgHBs), glicoproteina virusului stomatitei veziculare, glicoproteina D a virusului herpes simplex.

În general trebuie evitată prezența antigenilor care pot produce sensibilizări sau pot interfera răspunsul imun față de antigenul vaccinat.

Ca orice vaccin inert, impun administrarea de doze repetate. Imunogenitatea lor poate fi ameliorată prin asociere cu *adjuvanți imunologici* (fosfat și hidroxid de aluminiu, ulei de arahide, de cocos, poliribonucleotide sintetice).

Unele polizaharide bacteriene sunt haptene neimunogene și nu au putut fi mult timp folosite ca vaccinuri. Așa este polizaharida capsulară de *H. influenzae*. A fost obținut însă un valoros bivaccin prin cuplarea polizaharidei serovarului b, invaziv, de *H. influenzae* cu anatoxina tetanică (proteină *carrier*).

12.1.4. Antigeni vaccinanți produși prin inginerie genetică sau sinteză polipeptidică

Pe măsura identificării antigenilor vaccinanți au fost elaborate tehnologii standardizate de clonare a genelor care le codifică sau de sinteză a secvențelor polipeptidice semnificative. Aceste tehnologii prezintă dublu interes: obținere de vaccinuri contra unor virusuri necultivabile în prezent (e. g. virusul hepatitei B) și randamentul mare.

Clonarea genelor care codifică antigenii polizaharidici nu a fost încă posibilă.

Glicosilarea corectă a glicoproteinelor virale a fost posibilă numai în levuri, celule de mamifere sau insecte. *E. coli* nu este un vector adecvat acestui scop. Prin clonare în levură a fost obținut AgHBs, folosit ca vaccin de a doua generație contra hepatitei B.

O problemă comună a vaccinurilor clonate și a polipeptidelor sintetice este necesitatea cuplării eficiente cu o proteină *carrier* (e. g. anatoxina tetanică sau o polipeptidă care să stimuleze celulele T).

12.2. INDICAȚIILE VACCINĂRII

Vaccinările generale vizează întreaga populație infantilă sau adultă, în raport cu un program guvernamental stabilit în funcție de gravitate și prevalența într-o țară a anumitor infecții.

Vaccinările selective vizează grupe de populație cu risc crescut de a contracta o anumită infecție. E. g. vaccinarea antihepatită B a personalului din serviciile de chirurgie, de stomatologie, de hemodializă; vaccinarea colectivităților militare antigripală, antiadenovirus, antipneumococică, antimeningococică; vaccinarea antigripală a personalului medical; vaccinarea antiholerică a turiștilor în arii endemice de holeră; vaccinarea antitifoïdă în conjunctură epidemică ș. a.

Vaccinările elective vizează pacienți sau categorii de pacienți la care anumite infecții sunt mai frecvente și mai grave decât la populația generală. E. g. vaccinarea antirabică a persoanelor mușcate de animale, vaccinarea anti-*Pseudomonas aeruginosa* a pacienților

arși, vaccinarea antigripală a pacienților cu boli respiratorii cronice și cardiace, a diabeticilor, a vârstnicilor etc.

12.3. COMPLICAȚIILE VACCINĂRILOR

Boala infecțioasă indusă prin vaccinuri vii la persoane cu deficiențe ale apărării imune. Dacă reacția organismului adult la vaccinurile virale atenuate este cunoscută, reacția embrionului este alta. Așa este demonstrat efectul teratogen al vaccinului rubeolic administrat la gravide. Boala infecțioasă prin tulpini insuficient atenuate este foarte rară datorită controalelor riguroase pe care le impune astăzi avizarea unui vaccin.

Accidente alergice. Reacții anafilactice, reacții de tip Arthus sau reacții citolitice-citotoxice mediate prin anticorpi sau mediate celular se pot datora impurităților antigenice provenite din substratul de cultivare a tulpinii vaccinante (antigeni din ou, penicilină și alte antibiotice din culturile de celule) sau chiar antigenilor vaccinați. Reacții de tip Arthus s-au înregistrat după vaccinarea cu virus respirator sincițial sau antipneumococică la persoane care posedau anticorpi față de una din componentele vaccinului. Encefalomielite alergice apăreau după administrarea vaccinului antirabic preparat pe creier de iepure; vaccinul preparat pe embrion de rață le reduce semnificativ, dar totuși rar reacții anafilactice (sub 1%) și excepțional complicații neuroparalitice (0,001%). Vaccinul antirabic preparat pe linii celulare diploide de fibroblaști umani sau din pulmon fetal de maimuță elimină toate aceste inconveniente și este mai imunogen.

Reacții locale și sistemice (febră, mialgii, cefalee) apar frecvent după unele vaccinări, dar sunt pasagere, fără urmări.

12.4. CONTRAINDICAȚIILE VACCINĂRILOR

Contraindicațiile vaccinărilor sunt temporare și definitive.

Contraindicații temporare:

■ sarcina contraindică administrarea vaccinurilor virale atenuate și sarcina este contraindicată în următoarele 3 luni după o asemenea vaccinare. Restricția nu vizează anatoxinele și vaccinurile inactivate.

■ Bolile febrile acute pot fi agravate prin stresul vaccinal. Potențialul imun al organismului este mobilizat de microbul infectant și vaccinul poate rămâne ineficient. Infecția virală poate interfera cu infecția prin vaccinul viral atenuat. Unele viroze (gripa, rujeola ș. a.) deprimă răspunsul imun.

■ Este contraindicată vaccinarea sugarilor aflați încă sub protecția anticorpilor materni, deoarece aceștia deprimă, prin *feedback* anticorpice, răspunsul imun față de vaccinuri care induc imunitate umorală.

■ Tratamentele cu steroizi sau imunosupresive contraindică vaccinurile vii atenuate.

Contraindicații permanente:

■ Imunodeficiențe severe datorate celulelor T sunt contraindicații absolute pentru administrarea vaccinurilor vii atenuate ca vaccinul BCG, antivariolic etc. Dar în deficiențele mai puțin severe, inclusiv infecția cu HIV, vaccinarea antirujeolică poate fi încercată, riscul postvaccinal fiind similar celui după infecția naturală.

Deficiențele celulelor B nu sunt o contraindicație pentru vaccinurile nonvii (inactivate, cu componente antigenice purificate etc.), dar mai precaut în asemenea cazuri este a se recurge la imunizare pasivă (vezi 13.2).

În general sensibilizările atopice contraindică vaccinările. În cazuri speciale se vor face numai după avizul medicului infecționist, testarea eventualei sensibilizări la componentele vaccinului (tabelul 12.1) și alături cu trusa de urgență pentru tratamentul fenomenelor anafilactice.

Tabelul 12.1. Exemple de vaccinuri mai frecvente pentru imunizări profilactice

Boala sau microorganismul	Tipul vaccinului	Calea de administrare ¹	Numărul dozelor	Momentul și succesiunea dozelor	Observații
<i>Vaccinări generalizate</i>					
Difterie	Anatoxină	i.m.	6	1 la 2 luni vârstă 2 la 4 luni 3 la 6 luni 4 la 18 — 21 luni 5 la 5 ani 6 la 8 — 12 ani	Se poate asocia cu vaccinurile antitetanic și până la vârsta de 4—6 ani, antipertussis ²
Poliomielită	Viu atenuat	orală	4	1 la 5 luni 2 la 7 luni 3 la 15 luni 4 la 5 ani	Conține penicilină
Rujeolă	Viu atenuat	s.c.	1	12 luni	Conține proteine din ou, polimixină și neomicină
Tetanos	Anatoxină	i.m.	6	1 la 2 luni 2 la 4 luni 3 la 6 luni 4 la 18 — 21 luni 5 la 5 ani 6 la 8 — 12 ani	Se poate asocia cu vaccinurile antidifteric și, până la vârsta de 4—6 ani, antipertussis ²
Tuberculoză	Viu atenuat	i.d.	1	Prima săptămână de viață a copilului normoponderal	Revaccinări selective la vârsta de 10—12 ani, 21 ani se fac la persoane cu i. d. r. la tuberculină negative
Tuse convulsivă (pertusis)	Inactivat	i.m.	4	1 la 2 luni 2 la 4 luni 3 la 6 luni 4 la 18 — 21 luni	Numai până la vârsta de 4—6 ani se poate asocia cu vaccinurile antidifteric și antitetanic; după această vârstă componenta antipertussis este interzisă din cauza riscului encefalitei

Tabela 12.1 (continuare)

Boala sau microorganismul	Tipul vaccinului	Calea de administrare ¹	Numărul dozelor	Momentul și succesiunea dozelor	Observații
<i>Vaccinări selective</i>					
Antrax	Viu atenuat	s.c.	6	1 la ziua 0 2 la 2 săptămâni 3 la 4 săptămâni 4 la 6 luni 5 la 12 luni 6 la 18 luni	Vaccinare în condiții de risc: persoane care manipulează lână, biănuri, piei de animale, făină de oase
Febră tifoidă	Inactivat	s.c., i.d.	2	1 la ziua 0 2 la ziua 28	Vaccinare înaintea deplasării în arii endemice sau în caz de calamități. Reacțiile febrile sunt uzuale
Gripă	Inactivat	s.c.	1	Preepidemic	Conține proteine din ou. Administrare electivă la bolnavi cronici cardiovasculari, renali, la diabetici și vârstnici
Hepatită B	Antigen HBs purificat	i.m.	3	1 la ziua 0 2 la 1 lună 3 la 6 luni	Vaccinare în condiții de risc: chirurghi, stomatologi, personalul secțiilor de hemodializă, pacienți hemodializați, homosexuali, contacți sexuali ai purtătorilor de antigen HBs.
Holeră	Inactivat	s.c.	2	1 la ziua 0 2 la ziua 28	Vaccinare înaintea deplasării în arii endemice sau în caz de calamități. În urgențe inocularea a 2-a la minimum 7 zile. Necesare rapeluri la 6 luni
Rabie	Inactivat	i.m., i.d.	3	1 la ziua 0 2 la ziua 7 3 la ziua 21—28	Vaccinare în condiții cu risc de expunere: veterinari, hingheri, speologi
<i>Vaccinări electiv</i>					
Rabie	Inactivat	i.m., i.d.	5	1 la ziua 0 2 la ziua 3 3 la ziua 7 4 la ziua 14 5 la ziua 28	Vaccinare după expunere: mușcătură de animal turbat sau animal mușcător necunoscut

¹ Abrevieri: i.d. = intradermic; i.m. = intramuscular; s.c. = subcutanat.

² Revaccinările 5 și 6 se fac numai persoanelor cu i.d.r. Schick pozitivă. Persoanele cu i.d.r. Schick combinată se revaccinează cu doze fracționate pentru a evita reacții brutale de sensibilizare. Revaccinările 5 și 6 numai cu anatoxină tetanică nu necesită testare prealabilă (se pot face generalizat).

12.5. AUTOVACCINUL

Când infecțiile cronice rămân rezistente la tratamentul antimicrobian sau alte tratamente aplicate, se recurge uneori la prepararea și administrarea unui autovaccin ca remediu terapeutic posibil.

Autovaccinul este o suspensie omorâtă de bacterii izolate cu semnificație clinică de la un pacient și injectată aceluiași bolnav pentru a stimula formarea de anticorpi. Aceste preparate sunt deosebit de utile pentru pacienții hipo- și agamaglobulinemici care necesită administrări repetate sau cronice de anticorpi (100—300 mg/kg corp de imunoglobulină standard la 3 săptămâni interval alternativ cu perfuzie de plasmă 10 ml/kg corp la 2 săptămâni). *Imunoglobulinele obișnuite se administrează intramuscular. Pentru administrarea intravenoasă există preparate speciale* (e. g. gamavenin, sandoglobin sau, produsă de Institutul Cantacuzino din București, imunoglobulina pentru administrarea intravenoasă) foarte utile pentru pacienții cu hipo- și agamaglobulinemie care necesită administrare de doze mari.

În tabelul 12.1 sunt prezentate preparatele de care dispunem în practica medicală pentru imunizarea pasivă.

Antiserurile și imunoglobulinele hiperimune trebuie să îndeplinească două condiții esențiale:

- Să aibă *activitate neutralizantă* (antitoxică, antivirală) măsurată conform standardelor internaționale (e. g. unități antitoxice etc.). Aceste standarde variază de la antitoxină la antitoxină și nu constituie obiectul acestui manual.

- Să aibă o *aviditate cât mai mare*. Aviditatea traduce viteza cu care anticorpul și antigenul (toxina, virus) se leagă cât mai ferm; ea rezultă din suma forțelor de atracție dintre paratopii anticorpului și epitopii antigenului.

După standardizare serurilor hiperimune și imunoglobulinelor li se adaugă prezervanții necesari (vezi tabelul 2.6), după care sunt fiolate, etichetate și livrate pentru utilizare.

12.5.1. Metoda de preparare

Mai accesibilă este prepararea autovaccinurilor omorâte prin căldură.

1. Se izolează din prelevatul patologic de la bolnav bacteria cu semnificație clinică.
2. Se obține cultura pură și se identifică bacteria izolată.
3. Se repică abundant cultura pură pe plăci cu geloză nutritivă sau geloză-sânge și se incubează la 37°C peste noapte.
4. Se raclează ușor cultura cu o pipetă Pasteur cudadă în unghi drept și se prepară suspensia bacteriană în soluție salină izotonă fără a include eventuale particule din mediul de cultură, care pot da reacții nedorite după injectare. Se ajustează densitatea suspensiei bacteriene la 10⁹ germeni/ml folosind etalonul turbidimetric Mac Farland.

5. Se inactivează suspensia de germeni nesporulați prin încălzire în baia de apă la 60°C timp de 1 oră. Temperaturi mai mari pot afecta imunogenitatea vaccinului.

6. Pentru controlul sterilității, se inoculează 1 ml din suspensia inactivată în câte un tub cu bulion aerob, respectiv anaerob. Se incubează tuburile cu bulion 4 zile la 37°C, după care se repică pe câte o placă cu geloză-sânge incubată aerob, cu subcultură din bulion și, anaerob, cu subcultură din bulionul anaerob.

7. Dacă aceste culturi rămân sterile, se adaugă suspensiei vaccinante de fenol în concentrație finală de 0,3—0,5% ca prezervant.

8. Se repartizează, strict aseptice, suspensia în flaconașe pentru vaccin și se etichetează marcând: numele și prenumele pacientului, specia bacteriană, concentrația suspensiei și data preparării.

Mai frecvent este indicat autovaccinul stafilococic pacienților cu furuncule recurente, la care infecția se însoțește cu sensibilizare la antigenii stafilococici. Vaccinul cu 250—300 milioane stafilococi/ml se administrează subcutanat pentru desensibilizare și imunizare. Dozarea începe cu 0,1 ml și crește săptămânal cu câte 0,1 ml timp de 10 săptămâni. Este utilă asocierea anatoxinei stafilococice. Eficiența autovaccinului stafilococic este de cca 55%.

Există și alte procedee pentru prepararea autovaccinurilor, e. g. inactivarea prin formol; fiind mai complicate, nu insistăm aici asupra lor.

SERURILE DIAGNOSTICE ȘI CURATIVE (PROFILACTICE)

13.1. SERURILE DIAGNOSTICĚ

13.1.1. Seruri imune native, monospecifice și polivalente

Pentru identificarea antigenică a microorganismelor se utilizează truse cu seruri imune de referință, care se obțin inițial ca *seruri native* prin vaccinarea unor animale de experiență, uzual iepuri, cu diferite microorganisme. Însă microorganisme din specii diferite pot avea în comun unul sau mai mulți antigeni. Astfel, un ser imun corespunzător speciei vaccinante poate reacționa (aglutinare, precipitare etc.) nu numai cu bacteria omoloagă, ci și cu alte microorganisme cu care posedă antigeni comuni. Aceste reacții se numesc *reacții încrucișate* (*cross reactions*). Să presupunem că bacteria 1 are configurația antigenică XZ, bacteria 2 — YZ, iar bacteria 3 — WZ. Serul nativ obținut prin vaccinarea animalului de experiență cu bacteria 1 va conține anticorpii anti-X și anti-Z. Prin anticorpii anti-Z, acest ser nativ va reacționa (va aglutina suspensiile, va precipita extractele etc.) cu toate bacteriile care posedă antigenul *cross-reactiv* Z (e. g. bacteriile 1, 2, 3). Prin urmare, serul imun nativ nu poate fi utilizat ca atare pentru identificări antigenice corecte.

Seruri monospecifice se obțin prin *absorbția anticorpilor cross-reactivi*. În principiu, urmând exemplul de mai sus, serul nativ antibacteria 1 este diluat convenabil (e. g. 1:10) și amestecat cu o suspensie densă a bacteriei 2 sau 3 omorâtă prin încălzire timp de 30 minute în baie de apă la 60°C. După menținerea amestecului 2 ore în baie de apă la 37°C și peste noapte la +4°C, acesta este centrifugat. Serul supernatant este titrat față de tulpina omoloagă (al cărei antigen specific X vrem să-l păstrăm) și față de tulpina absorbantă (al cărei antigen Z vrem să-l îndepărtăm), pentru a verifica eficiența absorbției.

Serurile absorbite incomplet mai dau reacții încrucișate, dar la titruri semnificativ mai mici decât cu antigenul omolog. De aceea, spre exemplu, rezultatele reacțiilor de aglutinare pe lamă (care necesită seruri mai concentrate) trebuie verificate prin metoda mai sensibilă a aglutinării în tub. Prepararea unui ser monospecific de calitate necesită uneori repetarea absorbției de 2—3 ori. Pentru aceasta serul nativ trebuie să aibă un titru cât mai mare.

Serurile polivalente conțin anticorpi specifici mai multor serovaruri ale unei bacterii. Se obțin prin amestec de seruri monospecifice cu titru suficient de mare și sunt utilizate pentru triajul antigenic al bacteriilor cu numeroase serovaruri (e. g. *Salmonella*, *Shigella* ș. a.). O tulpină care a aglutinat cu un ser polivalent va fi identificată în continuare numai prin reacții cu serurile monospecifice corespunzătoare acestui ser polivalent.

Serurile monovalente și polivalente sunt prezervate cu fenol 0,5%, apoi fioleate. O conservare mai bună se realizează prin liofilizare. Toate fiolele sunt etichetate cu datele necesare pentru identificare și mențiunea titrului (diluția de lucru pentru identificarea

Tabelul 13.1. Seruri hiperimune disponibile pentru terapia și profilaxia toxiinfecțiilor, intoxicațiilor și infecțiilor

Boala, toxina sau microorganismul	Sursa serului hiperimun	
	ecvin sau bovin	imunoglobuline umane
Gangrenă gazoasă	X ²	
<i>Clostridium perfringens</i>	X ²	
Tetanos	X ²	X ³
Difterie	X ²	
<i>Shigella dysenteriae</i>	X ¹	
Botulism	X	
Antrax	X ¹	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X ²	
<i>Neisseria meningitidis</i>	X ¹	
Tuse convulsivă		X ³
Venin de șarpe (specific)	X	
Hepatită A		X
Hepatită B		X
Rujeolă		X ³
Rubeolă		X ³
Rabie	X ²	X ³
Varicella-zoster		X
Parotidită epidemică		X ³
Poliomielită		X
Herpes		X ³
Vaccină		X ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X ²	

¹ Livrate de Institutul Cantacuzino din București ca seruri hiperimune brute.
² Ibidem ca seruri hiperimune purificate și concentrate.
³ Livrate de Centrul Hematologic din București.

corectă a antigenului omolog). Diluțiile de lucru ale serurilor imune de referință se fac în soluție salină izotonă fenolată 0,3—0,5% și, pentru reacțiile de aglutinare, se păstrează în flaconașe picurătoare etichetate și grupate în baterii de identificare (e. g. pentru *E. coli* enteropatogen, *Salmonella*, *Shigella* ș. a.).

Controlul de calitate al serurilor imune de referință se face cu tulpini omoloage și heterologe. Tulpinile omoloage trebuie să reacționeze la diluții între 75 și 100% din titrul serului, iar cele heterologe până la cel mult 25% din titru. În reacțiile de aglutinare tulpinile martor trebuie periodic controlate dacă și-au menținut forma de cultură S și nu a început procesul de *rough*-izare (trebuie să formeze suspensii omogene, stabile în soluția apoasă 1:500 de acriflavină).

13.2. SERURI HIPERIMUNE CURATIVE (PROFILACTICE)

Prin seruri hiperimune se realizează imunizarea pasivă a organismului.

Indicații:

- protecția pacienților cu agamaglobulinemie față de infecțiile cu bacterii piogene sau unele virusuri în condiții de efort sau risc crescut pentru infecții respiratorii;
- protecția persoanelor nevaccinate în condiții de risc crescut pentru: tetanos (pacienți cu plăgi traumatiche, arsuri, avort septic), gangrenă gazoasă (pacienți cu plăgi traumatiche), contact de rujeolă, hepatită A, tuse convulsivă; risc de hepatită B după expunere acută prin contactul mucoaselor cu sânge HBs pozitiv;
- terapia unor toxiinfecții și intoxicații (difterie, tetanos, botulism).

Preparate utilizate. Imunizarea pasivă se realizează cu: *seruri hiperimune heterologe; seruri hiperimune heterologe purificate și concentrate: imunoglobulină umană standard* în soluții 10% și 16% (amestec de la mai mulți donatori adulți normali; conține anticorpi față de microorganismele care infectează majoritatea populației); *imunoglobulină umană hiperimună* (recoltată de la voluntari hiperimunizați prin vaccinare și revaccinare).

Avantaje: Eficiență imediată.

Dezavantaje:

■ Eficiența strict limitată în timp. La pacienții protejați pasiv semiviața IgG umane este de cca 23 zile, dar semiviața antitoxinelor preparate pe cal este de numai 7 zile și eliminarea se accelerează pe măsură ce apar anticorpii antigamaglobulină.

■ Sensibilizarea la proteinele heterologe. Testarea intradermică pentru depistarea sensibilizării la serul hiperimun heterolog de administrat evită *riscul șocului anafilactic*. *Boala serului* apare după administrarea terapeutică de ser hiperimun heterolog. Purificarea și concentrarea acestor seruri reduc riscul bolii serului după administrarea terapeutică, dar nu și pe cel al șocului anafilactic după administrări repetate. Imunoglobulinele standard și cele hiperimune, deși mai scumpe, reduc mult riscul sensibilizărilor. Singura contraindicație este la pacienții cu reacții anafilactice în antecedente.

MICROFLORA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN

14.1. CONTAMINAREA MICROBIANĂ, O CONSTANTĂ A MEDIULUI AMBIANT

În cavitatea uterină a mamei normale embrionul și fătul se dezvoltă în condiții sterile. O dată cu antrenarea fătului în canalul de naștere, suprafețele organismului sunt expuse continuu contaminării cu microorganisme provenite de la mamă, apoi de la persoane din anturaj și, progresiv, din tot mai multe elemente ale mediului ambiant.

14.2. COLONIZAREA MICROBIANĂ NORMALĂ

Multe microorganisme de contaminare mor și dispar pentru că nu se pot adapta condițiilor de nutriție și fizico-chimice sau intră sub incidența mecanismelor de eliminare microbiană proprii diferitelor învelișuri ale organismului.

Totdeauna între contaminanți se găsesc însă specii de microorganisme care proliferază, asimilează condițiile de găzduire și aderă la suprafețele organismului sau se înmulțesc mai repede decât sunt eliminate. Asemenea microorganisme sunt numite *microorganisme pionier*. Acestea au o existență tranzitorie, pentru că induc modificări ale biotopului¹ habitat, care le limitează creșterea sau chiar le elimină (modificări de pH, acumulare de metaboliți toxici, epuizarea unor nutrienți etc.). Aceste condiții inițiază o succesiune a microorganismelor de colonizare ale căror populații se echilibrează constituind populațiile *climax* caracteristice unei microbiocenoze relativ stabile, în echilibru cu condițiile de mediu.

Speciile pionier în tubul digestiv al sugarului hrănit la sân aparțin genului *Lactobacillus*. Prima succesiune se produce după 1—2 zile, când apar și se înmulțesc speciile de *Bifidobacterium*, care devin predominante numeric. Ulterior se adaugă *Escherichia coli*, enterococii ș. a. O succesiune majoră se produce o dată cu diversificarea alimentației când apar și se înmulțesc masiv bacteriile strict anaerobe nesporulate (*Bacteroides*, *Fusobacterium* ș. a.), iar cele aerobe și facultativ anaerobe diminuează numeric progresiv. Stadiul de climax al biocenozei intestinale este atins la înărcare.

Alte succesiuni în microbiocenozele organismului pot fi ritmate prin modificări normale ale potențialului de oxidoreducere sau a unui substrat nutritiv. De exemplu:

¹ *Biotop*: porțiune de spațiu, cu condiții particulare de viață, habitată (populată) și transformată de un ansamblu de organisme vii care constituie o *biocenoză*.

■ la copil înaintea erupției dentare și la edentați, lipsind crevasele gingivale, în microbiocenoza cavității bucale proporția bacteriilor aerobe, microaerofile și facultativ anaerobe (streptococi viridans *Neisseria* sp., *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) este mai mare;

■ la femeia adultă glicogenul depus în celulele mucoasei vaginale sub controlul hormonilor estrogeni favorizează înmulțirea speciilor de *Lactobacillus* în microbiocenoza vaginală.

Ansamblul microorganismelor de colonizare a suprafețelor și cavităților organismului constituie o entitate ecologică, care este numită *microflora (microbiota) indigenă*.

Limitele colonizării sunt condiționate de mecanismele de eliminare și barierele antimicrobiene. Astfel, în organismul nostru se delimitează zone normal sterile, zone ocazional contaminate sau periodic contaminate, dar necolonizate, de zone normal colonizate.

Zonele normal sterile: mediul intern, țesuturile, cavitățile seroase.

Zonele ocazional contaminate și necolonizate: sinusurile paranazale, urechea medie, etajul infraglotic al căilor respiratorii, căile biliare, căile urinare de la rinichi până la uretra proximală, căile genitale interne (proximal endocolului uterin la femeie, proximal uretrei la bărbat).

Zonele periodic contaminate, dar necolonizate: stomacul, duodenul, jejunul. Aici bariera acidă gastrică, enzimele digestive și bila reduc drastic numărul contaminanților, care, pe nemâncate, nu depășesc 10^5 bacterii/ml, iar bacteriile strict anaerobe și bacilii coliformi dispar aproape complet.

Zonele colonizate: colonul, ileonul terminal, cavitățile bucală, oro- și nazofaringiană, nazală, vaginul și uretra distală, tegumentul și conjunctiva.

14.3. MICROBIOCENOZELE ORGANISMULUI

Microflora normală a organismului este o sumă de microbiocenoze (tabelul 14.1) a căror componență se autoreglează prin interrelațiile stabilite, în condițiile date de găzduire, dintre microorganismele rezidente și cele flotante (noii contaminanți).

Bacteriile și fungii constituie majoritatea microflorei normale a omului. Bacteriile anaerobe domină asupra celor aerobe și facultativ anaerobe în proporție de 1000:1 până la 10:1, în funcție de microbiocenoza considerată. Protozoarele sunt mai slab reprezentate și apar mai des în condiții de conviețuire în promiscuitate. Micoplasmele sunt slab reprezentate, iar virusurile lipsesc.

Condițiile nutritive și fizico-chimice oferite de organismul omului conturează în microflora indigenă trei mari sectoare.

Primul sector include colonul și crevasele gingivale și se caracterizează prin umiditate, pH și mari cantități de materie organică variată, care favorizează o dezvoltare microbială foarte variată și luxuriantă, de ordinul a 10^{11-12} UFC/g de conținut al colonului sau 10^{8-9} UFC/mg de conținut al crevaselor gingivale, unde aproape tot volumul este ocupat de bacterii.

Microbiocenoza colonului însumează câteva sute de specii strict anaerobe, din care relativ puține au fost izolate *in vitro* și identificate până în prezent. Bacteriile anaerobe nesporulate reprezintă peste 99% din total. Clostridiile sunt prezente constant în cantități de ordinul 10^{5-9} UFC/g. Dintre bacteriile facultativ anaerobe domină net *Escherichia coli* cu cca 10^8 UFC/g. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, enterococii și stafilococii apar frecvent, dar în cantități de numai 10^{2-4} UFC/g (tabelul 14.1).

Tabelul 14.1. Microflora normală a adultului sănătos: principalele specii din microbiocenoze ale organismului (după T. Rosebury, 1965; B. S. Drasar și M. J. Hill, 1974; J. H. Tashjian, 1976)

Microorganismele	Frecvență ¹ /Concentrații ²			
	Colon	Gură	Orofaringe	Nazo-faringe
<i>Actinomyces</i> sp.	7,8/9,2	+	+	
<i>Bacteroides fragilis</i> (grup)	99,3/11,3			
<i>B. melaninogenicus</i> (grup)		+	+	+
<i>Bifidobacterium</i> sp.	74/10,2	+		
<i>Candida</i> sp.	14—31/0—5,4	6—49/0—5	6—28	
<i>Clostridium</i> , predominant <i>C. perfringens</i>	100/9,8	±		
Coci anaerobi: ■ grampozitivi ■ gramnegativi	94/10,7 34/7,9	++ 100/6—8	+	
<i>Corynebacterium</i> sp.	+	59	+	+
Enterobacteriaceae	98—100/7—9	65/0—3	+	21—23
<i>Eubacterium</i> sp.	94/10,7			
<i>Fusobacterium</i> sp.	18/8,4	14—28/3—5	+	
<i>Haemophilus</i> sp.		25—100	3—97	43—90
<i>Lactobacillus</i> sp.	78/9,6	95		
<i>Mycobacterium</i> sp.	+		±	±
<i>Mycoplasma</i> sp.		+	+	
<i>Neisseria</i> sp.		95—100/5—7	98	10—97
<i>Propionibacterium</i> sp.	±	±		
Stafilococi coagulazonegativi	31/7,4	75—100/1—4	±	+
<i>S. aureus</i>	11*/5,4	+	36—42	+
Streptococi: ■ grup D, inclusiv enterococi ■ pneumococi ■ piogeni ■ viridans	99/8,9 16** +	4—22 26 12—30/3—5 100/6—8	± 8—71 5—30 100	0—50 0—9 24—99
Spirocheți	28	+	+	
<i>Actinomyces</i> sp.				
<i>Bacteroides fragilis</i> (grup)		41/8,2	+	
<i>B. melaninogenicus</i> (grup)				
<i>Bifidobacterium</i> sp.			-	

Tabelul 14.1 (continuare)

Microorganismele	Frecvență ¹ /Concentrații ²					
	Nas	Vagin	Organe genitale externe	Uretră distală	Piele	Conjunctivă
<i>Actinomyces</i> sp.						
<i>Bacteroides fragilis</i> (grup)		41/8,2	+			
<i>B. melaninogenicus</i> (grup)						
<i>Bifidobacterium</i> sp.						
<i>Candida</i> sp.		28—46	+	±	±	+
<i>Clostridium</i> , predominant <i>C. perfringens</i>		18/8,2	+	±	±	
Coci anaerobi: ■ grampozitivi ■ gramnegativi		86/8,7 9/7,6	±	±	±	
<i>Corynebacterium</i> sp.	+	31—74/7,2	+	+	53/5	3—83
<i>Enterobacteriaceae</i>	±	20—27/6,4	+	+	±	
<i>Eubacterium</i> sp.		36/8,4				
<i>Fusobacterium</i> sp.		23/8,5	+	+		
<i>Haemophilus</i> sp.	+					±
<i>Lactobacillus</i> sp.		45—86/8,2		±		
<i>Mycobacterium</i> sp.	±		+	±	+	
<i>Mycoplasma</i> sp.		+		+		
<i>Neisseria</i> sp.	12	+		+		±
<i>Propionibacterium</i> sp.	+	14/8,6		±	45—100/6	
Stafilococi coagulazonegativi	90	28—94/7,5	+	++	88—100/2—6	37—94
<i>S. aureus</i>	22—85	5—15/6,7		±	5—24*	0—30
Streptococi: ■ grup D, inclusiv ■ enterococi ■ pneumococi ■ piogeni ■ viridans	0—5 ±	27/7,0 ± 14/6,6	+	+		0—5 ±

Microorganismele	Frecvență ¹ /Concentrații ²					
	Nas	Vagin	Organe genitale externe	Uretră distală	Piele	Conjunctivă
Spirocheți			+			
¹ ± = rar; + = comun; ++ = foarte frecvent; cifrele fără alte mențiuni indică frecvența procentuală. ² Concentrații exprimate ca log ₁₀ (e. g. 7-9/g corespunde la 10 ⁷ -10 ⁹ UFC/g). • Asociat cu portajul nazal. *** Grup B, C, F, G, dar nu A.						

Microbiocenoza crevaselor gingivale este dominată de streptococi viridans, bacterii anaerobe nesporulate (specii pigmentogene de *Bacteroides*, specii de *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Neisseria* nepretențioase etc.

Ileonul este o zonă de tranziție, de la stomac la colon, în care colonizarea cu bacterii aerobe și anaerobe ajunge progresiv la cantități de ordinul 10⁷ UFC/g.

Al doilea sector include vaginul și căile aerodigestive superioare unde secrețiile, resturile celulare, respectiv și alimentare, oferă condiții pentru dezvoltarea unei microflore abundente cu cca 10⁹ UFC/g de conținut oral sau vaginal.

Microbiocenoza vaginului, de la pubertate până la menopauză, este dominată, cu cantități de 10⁸⁻⁹ UFC/g, de *Lactobacillus* sp., care prin fermentarea glicogenului din epiteliul vaginal asigură mucoasei un pH ușor acid. Frecvent, în cantități asemănătoare, se asociază și alte bacterii anaerobe: *Bacteroides* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Veillonella* sp. Dintre bacteriile aerobe care se izolează în cantități de cca 10⁶ UFC/g reținem: streptococi viridans, *Staphylococcus epidermidis*, *Gardnerella vaginalis*. Frecvente, dar în cantități reduse, sunt levuri din genul *Candida* (tabelul 14.1).

Microbiocenozele gurii și faringelui reunesc peste 200 specii. Bacteriile anaerobe nesporulate și streptococi viridans domină constant cu cantități de ordinul a 10⁶⁻⁸ UFC/g, urmați fiind de neisserii nepretențioase cu 10⁵⁻⁷ UFC/g. Frecvent izolați, dar în cantități mai mici de 10⁴⁻⁵ UFC/g sunt *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus* sp., bacilii difterimorfi, pneumococi, streptococi β-hemolitici (*S. pyogenes*, streptococi grup C, G), *Candida albicans*.

Al treilea sector include tegumentul. Condițiile de găzduire (umiditate, pH, densitatea unităților pilosebacee, secreția sebacee și sudorală) influențează larg în special cantitatea microorganismelor de colonizare: scalpul cu 10⁵⁻⁶ UFC/cm², fața cu 10³⁻⁶ UFC/cm², nările cu 10⁴⁻⁷ UFC/ml spălătură, conductul auditiv extern cu 10⁵⁻⁶ UFC/cm², pliurile axilare, inghinale, perineale, interdigitale cu cca 10⁶ UFC/cm² comparativ cu trunchiul și membrele care au numai 10¹⁻³ UFC/cm².

Microflora cutanată este dominată de stafilococi coagulazonegativi, care colonizează mai superficial unitățile pilosebacee, orificiul glandelor sudoripare, crevassele stratului cornos, scuamele, părul și unghiile sub formă de microcolonii care grupează de la câțiva până la sute și mii de coci. *Propionibacterium acnes* colonizează mai profund unitățile pilosebacee. Corinebacteriile nepatogene și levurile lipofile (*Malassezia* sp.) completează gama descrisă de microorganisme rezidente pe tegument. Frecvent, mai ales în condiții de igienă precară, pe tegument se dezvoltă și fungi dermatofiji (*Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum* sp.).

Nările sunt cel mai important rezervor de stafilococi din organism. *S. epidermidis* este prezent constant, iar rata portajului nazal de *S. aureus* variază de la 20-30% în colectivitatea generală până la 70% în mediul de spital.

14.4. ROLUL FIZIOLOGIC AL MICROFLOREI INDIGENE

14.4.1. Rolul nutritiv

La om microbiocenozele colonului furnizează importante cantități de vitamine din grupul B, vitaminele E și K. La animale, mai ales la ierbivore și rozătoare, implicațiile microflorei colonului în digestie și nutriție sunt mai importante.

14.4.2. Rolul protector

Microbiocenozele organismului ajunse în stadiul de climax funcționează ca *bariere ecologice*:

- *Se opun invadării suprafețelor organismului de către microbi patogeni* prin fenomene de antagonism microbial nespecific (competiția pentru substrat nutritiv și spațiu vital, producere de metaboliți cu acțiune antimicrobiană: H_2O_2 , pH acid) și specific (producere de bacteriocine).

- *Elimină microorganismele infectante* cu aceeași eficiență și, probabil, prin același mecanism care îndepărtează markerii de control inerți cum sunt sporiile unor specii termofile de *Bacillus*, incapabili să germineze.

În acest mod bacteriile patogene sunt menținute temporar la densități inofensive caracteristice stării de «*purtător sănătos*».

- *Asigură rezistența la colonizare și translocarea intestinală*. La sugari bacteriile aerobe și facultativ anaerobe sunt translocate din intestin, mai des din ileon, în curentul sangvin.

Când tulpina translocată are potențial patogen particular, e. g. tulpini de *Escherichia coli* serovar K1, urmările sunt grave (septicemii, meningite). O dată cu apariția bacteriilor anaerobe nesporulate în microbiocenoza intestinală colonizarea cu bacterii aerobe și facultativ anaerobe este drastic limitată, iar translocarea devine nesemnificativă. Reapare în condiții de dismicrobism, devenind periculoasă la pacienții cu deficite ale apărării antiinfecțioase sistemice (cancerosi, imunosupresați).

14.4.3. Efecte negative

Unele enzime, cum sunt β -glucozidaza, β -glucuronidaza, nitroreductaza, azoreductaza, $7\text{-}\alpha$ -dihidrolaza, sunt produse de către microflora colonului în cantități mai mari la omnivori decât la vegetarieni, urmare a unor fenomene de inducție. Sub acțiunea acestor enzime unii aminoacizi, nitrații, azocoloranții alimentari se transformă în substanțe carcinogene. Așa se explică de ce cancerul de colon sau rect este semnificativ mai frecvent în colectivitățile cu dietă bogată în carne decât în cele cu dietă vegetariană.

Excesul de grăsimi alimentare determină o creștere a concentrației deoxicolatului sau litocolatului din intestin, unde, sub acțiunea enzimelor bacteriene, capacitatea lor de cofactori carcinogeni crește. Bacteriile intestinale nu numai că pot genera analogi de estrogeni din steroizii biliari, dar, prin β -glucuronidazele și sulfatazele pe care le produc, deconjugă estrogenii eliminați de ficat ca glucuronizi și sulfați, determinând reabsorbția lor intestinală (ciclul enterohepatic al estrogenilor). Prin ambele mecanisme bacteriile influențează evoluția cancerelor de sân estrogen dependente. La femeile adulte din colectivitățile vegetariene, eliminarea fecală a estrogenilor este de trei ori mai mare, iar eliminarea urinară de estrol-3-glucuronat (produsul de conjugare al estrogenilor intestinali în cursul resorbției prin mucoasa colonului, care nu se mai elimină prin ficat, ci prin rinichi) este semnificativ mai scăzută decât la femeile de aceeași vârstă din colectivitățile omnivore.

14.4.4. Microorganismele probiotice

Aceste microorganismele adăugate la dietă influențează benefic organismul gazdei prin ameliorarea echilibrului din microbiocenoză ca stimulenți de creștere prin ameliorarea conversiei alimentelor, protecție față de infecții intestinale etc.

La om mai bine studiate sunt efectele probiotice ale lactobacililor. Epidemiologii atestă că în colectivitățile cu regim lactat sau lactovegetarian frecvența cancerului este mai scăzută. O asemenea dietă favorizează speciile de *Lactobacillus* din colon. Efectul anticancerigen al lactobacililor a fost explicat prin represiunea la bacteriile din colon a enzimelor implicate în conversia substanțelor precarcinogene în carcinogene și prin inhibarea creșterii celulelor tumorale.

14.5. DISMICROBISMUL

Dismicrobismul, adică dezechilibrul unor microbiocenoză ale organismului uman, alterează rolul de barieră ecologică a microflorei și deschide calea infecției sau produce ei însuși perturbări resimțite de pacienți. Cauze de dismicrobism:

1. *Lipsa sau insuficiența unor bariere antimicrobiene.* La pacienți cu hipo- sau aclorhidrie gastrică numărul bacteriilor din duoden și jejun depășește 10^6 UFC/ml, cu predominanța bacililor coliformi și a bacteriilor anaerobe. În aceste condiții infecții ale căilor biliare sunt frecvente, mai ales dacă se asociază și alte condiții favorizante (dischinezii, litiază, diverticuli duodenali etc.).

2. *Modificarea substratului nutritiv oferit pentru dezvoltare.* La persoanele cu ten seboreic excesul de sebum stimulează dezvoltarea stafilococilor, ale căror lipaze eliberează din sebum cantități sporite de acizi grași care irită țesuturile și favorizează apariția acnei, o infecție stafilococică superficială.

Deficitul congenital de β -galactozidază determină intoleranța la lapte (aliment bogat în lactoză). Lactoza neabsorbită în intestin este fermentată de microflora colonului cu acumulare de acizi iritanți și de substanțe osmotice active, care, prin aflux hidroelectrolitic, determină diaree.

3. *Modificarea condițiilor fizico-chimice de găzduire.* Transpirația abundentă favorizează colonizarea excesivă a tegumentelor cu *Malassezia furfur*, care determină pitiriazis verzicolor (o cheratomicoză).

4. *Modificarea receptorilor epiteliali pentru liganzii bacterieni.* În condiții de stres și la vârstnici scade proporția fibronectinei în glicocalixul orofaringian. Fibronectina fiind parte a receptorilor pentru liganzii streptococilor viridans, proporția acestor bacterii cu rol important de barieră ecologică scade. Locul lor este luat de bacili gramnegativi care au un potențial patogen mai mare și pot iniția infecții respiratorii dacă pacienții au deficiențe ale apărării antiinfecțioase locale sau sistemice.

5. *Administrarea de antibiotice* labilizează microbiocenozele organismului, prin eliminarea bacteriilor sensibile, și permite colonizări anormale cu contaminanți rezistenți. Sub acțiunea tetraciclinelor microbiota colonului, cavității bucale, vaginului și pliiurilor anovulare ajunge dominată de *Candida albicans*, levură natural rezistentă la antibioticele antibacteriene, care poate iniția infecții la aceste niveluri. Cunoscute după administrarea unor antibiotice sunt

colitele pseudomembranoase, adevărate boli ecologice. Frecventă, mai ales după administrarea de clindamicină sau lincomicină, este înmulțirea necontrolată a *Clostridium difficile*, care elaborează o citotoxină responsabilă de acest sindrom diareic grav.

Medicul trebuie să cunoască microflora indigenă a organismului uman pentru:

- a preveni și combate condițiile cauzatoare de dismicrobism;
- a reduce contaminarea prelevatelor patologice cu microfloră, e. g. prelevări «curate» sau pe căi care șuntează traiectele naturale contaminante;
- a stabili corect semnificația microorganismelor depistate în prelevate din zone contaminate sau contaminate la eliminarea prin traiecte colonizate.

Partea a doua

**BACTERIOLOGIE
SI MICOLOGIE SPECIALA**

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STAFILOCOCICE

15.1. DATE GENERALE

15.1.1. O minidefiniție

Stafilococii sunt coci sferici grampozitivi, așezați în perechi sau ciorchini. Dimensiunile și capacitatea de a reține colorația Gram sunt variabile. Sunt imobili, nesporulați. Facultativ anaerobi, atacă zaharurile fermentativ.

15.1.2. Repere taxonomice

Genul *Staphylococcus* face parte din familia *Micrococcaceae* alături de alte genuri cum sunt: *Micrococcus* și *Stomatococcus*, prezente pe învelișurile omului și animalelor de unde se răspândesc în mediul ambiant. Microscopic asemănător cu stafilococii este genul *Peptococcus* cu o singură specie: *P. niger*, strict anaerobă.

Conform clasificării actuale genul *Staphylococcus* reunește 19 specii, pe care, practic, le putem împărți astfel:

■ Stafilococi coagulazopozitivi:

S. aureus, specie antropozofilă

S. intermedius, specie zoofilă

■ Stafilococi coagulazonegativi:

S. hominis }

S. haemolyticus }

S. capitis ș. a. }

specii antropofile

S. epidermidis }

S. saprophyticus }

specii antropozofile

S. gallinarum }

S. caprae ș. a. }

specii zoofile

Mai frecvent în patologia umană sunt implicate *S. aureus*, specie condiționat patogenă, *S. epidermidis* și *S. saprophyticus*, specii accidental patogene. Diferențierea acestor specii cu interes pentru microbiologia medicală se face după gama de caractere consemnate în tabelul 15.1.

Tabelul 15.1. Diferențierea speciilor principale de *Staphylococcus*

Caractere	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulază	+	—	—
Fosfatază	+	+	—
Arginindehidrolază	+	+	—
Nitratreductază	+	+	—
Fermentarea manitei	+	—	—
Oxidarea:			
■ manitei	+	—	+
■ galactozel	+	+	—
■ manozel	+	+	—
■ ribozel	+	—	—
Rezistența la novobiocină (CMI $\geq 1,6 \mu\text{g/ml}$)	S	S	R
S — sensibil, R — rezistent.			

15.1.3. Habitat

S. epidermidis este găzduit constant, iar *S. saprophyticus* ocazional, pe tegumente și în nări.

În colectivitatea generală, între 20 și 40% din persoanele normale găzduiesc *S. aureus* în nări și un procent asemănător în intestin, iar la personalul de spital procentul purtătorilor crește până la 70—80. Prezența *S. aureus* pe tegumente este tranzitorie, rezervorul nazal, cel intestinal și leziunile stafilococice sunt cele care contaminatează tegumentul cu această specie.

Habitatul natural al stafilococilor și rezistența la uscăciune explică prezența lor foarte frecventă în aer, în alimente și pe cele mai variate suprafețe din ambianța noastră. Frecvent contaminatează prelevatele patologice și impun criterii ferme pentru argumentarea semnificației clinice a tulpinilor izolate de la pacienți.

S. aureus este un important indicator sanitar de contaminare cu secreții nazofaringiene a aerului și a suprafețelor din blocul operator, maternități, colectivități de copii și instituții medicale.

15.1.4. Factori de patogenitate

S. aureus este o bacterie condiționat patogenă invazivă și toxigenă cu numeroși, dar foarte variabili, factori de patogenitate.

Capsula și *proteina A* au efecte antifagocitare.

Coagulazele elaborate de peste 96% din tulpini, coagulează plasma prin activarea unui factor similar trombinei (coagulaza liberă) sau direct (coagulaza legată de celula cocilor). Elaborate în faza logaritmică de dezvoltare, coagulazele pot fi antifagocitare prin

fibrina depusă pe suprafața stafilococilor. Favorizează apariția trombilor septici endovenosi în focarul de infecție stafilococică.

Hemolizinele, în număr de patru (α , β , γ și δ), sunt exotoxine cu efect letal, dermonecrotic și membranodistructiv asupra hematiilor, leucocitelor, mastocitelor, trombocitelor și celulelor tisulare.

Leucocidina lezează membranele celulare și lizozomale ale leucocitelor.

Exfoliatina (epidermolizina) este o exotoxină, care difuzează și la distanță de focarul infecțios cutanat și rupe desmozomii stratului spinocelular, provocând decolarea părților superficiale ale epidermei de stratul granulos cu formare de flictene, leziuni întâlnite în «sindromul stafilococic al pielii opărite» — boala Ritter, sindromul Lyell, impetigo bulos.

Toxina 1 a sindromului șocului toxic, abreviat TSST-1, numită și toxina pirogenă, determină febră și un rash scarlatiniform. Inoculată experimental, mărește de 50 000 de ori sensibilitatea iepurilor la șocul endotoxinic.

Enterotoxinele, A, B, C, D, E și F, termostabile și rezistente la enzimele digestive, acționează asupra mucoasei digestive și sistemului nervos central, determinând hiper-salivație, grețuri și vărsături grave, dureri epigastrice și, uneori, diaree apoasă. Doza toxică se realizează când în aliment tulpina enterotoxigenă de *S. aureus* depășește concentrații de 10^5 UFC/g (ml). Semnele de boală apar după o incubatie de 3—6 ore și persistă 1—2 zile până la eliminarea toxinei din organism.

Alți factori de patogenitate ai *S. aureus* sunt: *hialuronidaza*, factor de difuziune tisulară, *stafilokinaza*, fibrinolizina cu rol posibil în generarea septicopioemiilor stafilococice prin liza trombilor septici endovenosi, *lipaze*, care îi explică tropismul pentru unitățile pilosebacee.

S. epidermidis și *S. saprophyticus* au un echipament de patogenitate modest din care putem reține prezența variabilă a hemolizinelor, dar mai ales a glicocalixului cu rol de ligand la epiteliu și suprafața cateterelor.

15.1.5. Receptivitatea la stafilococi

Raportată la frecvența portajului, frecvența infecțiilor determinate de *S. aureus* este relativ redusă. Deficiențe ale apărării antiinfecțioase locale și sistemice deschid calea infecțiilor stafilococice. Când aceste deficiențe sunt foarte importante, își pot manifesta potențialul de patogenitate redus chiar și stafilococii coagulazonegativi.

15.1.6. Infecțiile stafilococice

S. aureus determină infecții cu caracter supurativ, piogen: foliculite, furuncule, carbuncul, hidrosadenită, panariții, flegmoane, infecții ale plăgilor. Infectează mucoasele cu apărarea antiinfecțioasă compromisă: otite, sinuzite (complicate eventual cu meningite), pneumonii postgripale; endometrite post-partum și post-abortum. Infecțiile cu *S. aureus* pot evolua bacteriemic și septicemic cu metastaze septice (osteomielite, abcese viscerale). Uneori este implicat în uretritele și prostatitele nespecifice. Frecvente sunt toxiiinfecțiile alimentare stafilococice. Enterocolitele stafilococice, ca disbioze ale antibioticoterapiei, sunt posibile.

S. aureus cauzează frecvent cazuri sporadice sau izbucniri epidemice de infecții nozocomiale.

S. epidermidis poate determina foliculite, acnee, blefarite. La pacienți cu proteze valvulare cardiace cauzează endocardite subacute. În cursul cateterismelor venoase prelungite generează bacteriemii de cateter.

S. saprophyticus este cunoscut ca o cauză de cistită la femei tinere active sexual.

15.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR STAFILOCOCICE

15.2.1. Diagnosticul microbiologic

15.2.1.1. Prelevate patologice

Prelevatele patologice examinate sunt în funcție de tipul infecției: puroi, sânge, inserția intravenoasă a cateterelor, lichid cefalorahidian, spută, raclat uterin în endometrite, urină, materii fecale.

În toxiinfecțiile alimentare se prelevă probe de alimente, tampoane nazale de la personalul care manipulează alimentele, lichidul de lavaj al mâinilor și ustensilelor din bucătărie.

15.2.1.2. Microscopia directă

Se efectuează și se colorează Gram frotiuri, care sunt examinate prin obiectivul cu imersie. Se urmărește prezența cocilor sferici grampozitivi izolați, în perechi sau, caracteristic, în grămezi neregulate în contextul inflamator caracterizat prin prezența leucocitelor, frecvent alterate și a fibrinei. În funcție de produs, pot apărea și celule tisulare alterate.

În infecții cronicizate stafilococii pot să apară gramvariabili, de unde riscul confundării lor cu *Neisseria* în prelevatele din uretrite, prostatite, cistite.

Microscopia, ca primă etapă, este orientativă, dar indispensabilă pentru interpretarea corectă a semnificației stafilococilor izolați în cultură.

15.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează o ansă din prelevatul patologic sau tamponul de prelevare pe mediul de izolare:

— geloză-sânge: prelevate necontaminate sau cu contaminare redusă ca puroi, lichid cefalorahidian, tampon nazal etc.;

— hiperclorurat cu lapte și ou, hiperclorurat cu manitol (Chapman): prelevate hipercontaminate ca materii fecale, alimente, spută.

Etapa II. După incubare aerobă peste noapte la 37°C, stafilococii formează colonii S, cu diametrul de 1–2 mm, bombate, opace, pigmentate auriu, alb sau galben, cu sau fără hemoliză completă pe geloză-sânge și cu halou opac determinat de lecitinază pe geloză cu lapte și ou. Pe mediul Chapman coloniile de *S. aureus* sunt manitopozitive (galbene prin fermentarea manitei). Alți stafilococi sunt manitonegativi.

Un număr de 3—4 colonii tipice, bine izolate, pe geloză-sânge sunt controlate microscopic și repicate pe pantă de geloză, pentru a obține suficientă cultură pură în vederea identificării. Coloniile sugestive de pe mediile selective hiperclorurate vor fi reepuizate pe o placă cu geloză-sânge, pentru a verifica puritatea culturii (pot conține bacterii de contaminare inhibate).

Etapa III. Cultura pură, verificată microscopic, este supusă testelor de identificare (tabelul 15.1).

■ *Depistarea coagulazei legate (clumping factor)*. Pe o lamă de microscop, într-o picătură de apă, se omogenizează o ansă din cultura pură pentru a obține o suspensie lăptoasă. Se inmoaie un fir drept în plasmă de iepure și se agită, prin mișcare circulară continuă, timp de 5 secunde, în suspensie bacteriană. Aglutinarea stafilococilor din picătură în interval de 10 secunde semnifică un test pozitiv. Testul negativ, absența aglutinării, trebuie confirmat prin testul coagulazei libere, în tub.

NOTĂ: Nu se suspensionează stafilococi în soluție salină (cauză de rezultate fals negative cu unele tulpini). Un exces de plasmă (e. g. o ansă) poate cauza rezultate fals pozitive.

■ *Testul coagulazei libere*. Într-un tub 10/100 mm cu 0,5 ml plasmă citratată de iepure diluată 1/4 se suspensionează o ansă plină din cultura pură. Se incubează în baie de apă la 37°C și se verifică, prin înclinarea tubului, după 30 minute și 4 ore apariția cheagului. În caz de rezultat negativ în acest interval, se lasă tubul până a doua zi la temperatura camerei și se urmărește din nou apariția cheagului.

■ Se epuizează cultura pe geloză cu 0,01% fosfat de fenolftaleină și se incubează peste noapte la 37°C. Se expune cultura vaporilor de amoniac (o bucată de hârtie de filtru îmbibată cu amoniac și fixată pe capacul plăcii Petri). În interval de 1—2 minute coloniile stafilococilor producători de *fosfatază* devin roz-roșii.

■ *Fermentarea sau oxidarea zaharurilor* sunt urmărite prin testul O/F.

■ *Rezistența la novoblocină* poate fi testată o dată cu antibiograma tulpinii semnificativă clinic supusă identificării.

Diagnosticul septicemiilor stafilococice impune hemoculturi repetate. În condiții de antisepsie și asepsie stricte, se recoltează 5—10 ml sânge din vena cubitală și se însămânțează în 50—100 ml bulion glucozat (proporția finală — sânge: bulion = 1:10). Hemoculturile incubate la 37°C timp de 7—10 zile se urmăresc macroscopic, microscopic și prin repicare pe geloză-sânge în zilele 1; 2; 3; 5; 7 și 10. Coloniile izolate din hemoculturi se identifică conform testelor precizate mai sus.

În toxiinfecțiile alimentare, *S. aureus* poate fi demonstrat ca agent etiologic pe baza următoarelor criterii:

a) Izolarea *S. aureus* în concentrații mai mari de 10^5 UFC/g (ml) de aliment.

b) Izolarea aceluiași lizovar de *S. aureus* (vezi mai jos) din vomă sau fecale de la bolnavi, din alimentele incriminate pe baza celui mai mare indice de atac epidemiologic (torturi, creme, înghețate, produse lactate ș. a.) și de la purtătorii din personalul care a manipulat alimentele.

c) Depistarea enterotoxinelor stafilococice în alimente (reamintim termorezistența lor), în vomă sau culturi prin testul biologic la pui de pisică în greutate de 600—800 g injectate intraperitoneal. Dar testul are o reproductibilitate insuficientă. Testul de referință este, pentru laboratoarele care dispun de reactivii necesari, identificarea enterotoxinelor prin imunodifuzie în gel cu seruri antienterotoxice polivalent și monovalente (A, B, C, D, E, F).

15.2.2. Diagnosticul serologic

Poate fi încercat în stafilocociile cronice. Se dozează anti- α -hemolizina. Serul persoanelor normale conține între 0 și 2 unități antitoxice/ml. În stafilococii titrul antitoxic crește peste 2 UA/ml ser.

15.2.3. Investigarea epidemiologică a infecțiilor stafilococice nozocomiale

Demonstrarea filiației cazurilor de stafilococi în focarul epidemic și identificarea sursei de infecție pentru măsurile de combatere și profilaxie impune *lizotipia* conform unei scheme cu truse de bacteriofagi stafilococici selectați pentru tulpinile umane și, respectiv, animale. Izolarea aceleiași lizovar stafilococic din prelevatele patologice de la bolnavi, de la purtători sau din alimente demonstrează fenomenul epidemic.

15.2.4. Biopreparate și antibiotice pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul stafilocociilor

- Imunoglobulină antistafilococică.
- Ser imun antistafilococic.
- Plasmă antistafilococică.
- Anatoxină stafilococică.
- Vaccin omorât.
- Autovaccin.
- Seruri antienterotoxice (A, B, C, D, E, F).
- Bacteriofagi stafilococici.
- Antibiotice utile în tratamentul stafilocociilor:

a) În infecțiile cu tulpini neproducătoare de β -lactamaze: penicilina G (asociată cu gentamicină în infecțiile severe și septicemii). Alternativ, pentru pacienții sensibilizați la peniciline, eritromicină, lincomicină, cefalosporină, rifampicină, pristinamicină, vancomicină (rezervată cazurilor determinate de tulpini rezistente la alte antibiotice).

b) În infecțiile cu tulpini producătoare de β -lactamaze: o penicilină de semisinteză rezistentă la penicilinaza stafilococică (oxacilină etc., asociată cu gentamicină în infecțiile severe). Antibiotice alternative vezi mai sus.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STREPTOCOCICE

16.1. DATE GENERALE

16.1.1. O minidefiniție

Streptococii sunt coci sferici sau ovali, grampozitivi, așezați în perechi sau lanțuri. Tipic sunt imobili, dar există tulpini mobile; nesporulați. Facultativ anaerobi și catalazonegativi, atacă zaharurile fermentativ.

16.1.2. Repere taxonomice

Streptococii sunt reuniți în două genuri: *Streptococcus* și *Enterococcus*. Microscopic asemănător cu genul *Streptococcus* este genul *Peptostreptococcus*, care reunește specii strict anaerobe.

Pentru izolarea și identificarea prezumtivă a streptococilor, se aplică trei criterii de clasificare: aspectul hemolizei pe geloză-sânge, structura antigenică și habitatul.

■ *Aspectul hemolizei determinată pe geloză-sânge* divizează streptococii în β -hemolitici, α -, α -prim-hemolitici și nehemolitici.

Streptococii β -hemolitici au coloniile înconjurate cu o zonă largă de hemoliză clară, completă, cu periferia bine definită.

Streptococii α -hemolitici dau zonă de hemoliză incompletă, verzuie (formare de methemoglobină), cu periferie vagă.

Streptococii α -prim-hemolitici determină în imediata vecinătate a coloniilor hemoliză incompletă verzuie, înconjurată cu un halou de hemoliză clară, completă.

■ *Structura antigenică.* Mulți streptococi au în structura peretelui un antigen cu specificitate de grup, polizaharida C, care, extrasă prin diferite metode, poate fi identificată prin reacții de precipitare, coaglutinare sau latex-aglutinare. În raport cu specificitatea polizaharidei C, Rebecca Lancefield a diferențiat 19 grupe antigenice, numite cu litere majuscule de la A la H și de la K la V.

Unii streptococi α -hemolitici, cum sunt pneumococii și streptococii viridans, nu pot fi incluși în grupele Lancefield și se identifică prin teste biochimice și sensibilitatea la agenți fizici sau chimici.

Antigenii proteici M diferențiază streptococii grup A în 58 serovaruri, pe cei grup C în 8, iar pe cei grup G în 3. Alt antigen, proteina T, diferențiază streptococii grupului A în 30 serovaruri.

Pneumococii sunt împărțiți prin polizaharida capsulară în 83 serovaruri.

■ După habitat și patogenitate se deosebesc:

— Streptococi piogeni, care determină infecții cu caracter supurativ la om și animale. Majoritatea sunt β -hemolitici (streptococii grup A, care constituie specia *S. pyogenes* cu habitat uman, streptococii grup C cu mai multe specii umane sau animale, streptococii grup G, neafiliați încă unei specii), iar unii α -prim-hemolitici (*S. agalactiae*).

— Streptococii orali, din flora cavității bucale, sunt accidental patogeni. Majoritatea sunt α -hemolitici (streptococii viridans), unii nehemolitici.

— Streptococii fecali habitează intestinul și sunt condiționat patogeni. Majoritatea sunt α - sau nehemolitici și numai puțini β -hemolitici. Aparțin grupului D. Speciile individualizate prin capacitatea de a cultiva la 10°C, la 45°C și în concentrații de 6,5% ClNa, și de a hidroliza esculina pe mediu cu 40% bilă constituie grupul enterococilor (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ș. a.).

Streptococii lactici — flora laptelui și a derivatelor — aparțin grupului N și sunt α -hemolitici.

16.1.3. Factori de patogenitate

Dintre streptococii piogeni, cel mai complex echipament de patogenitate îl are *S. pyogenes*. Distingem factori de patogenitate structurali și factori de patogenitate solubili (toxine și agresine).

Factorii de patogenitate structurali sunt: capsula, proteina M și fimbriile.

Capsula de acid hialuronic nu este imunogenă, fiind structural asemănătoare cu acidul hialuronic din organismul nostru. Intervine ca factor antifagocitar numai în stadiile inițiale ale infecției, ulterior fiind hidrolizată hialuronidaza streptococică.

Proteina M, cu efecte antifagocitare, este cel mai important antigen de virulență al *S. pyogenes* și al altor streptococi piogeni.

Fimbriile, formate din proteină M acoperită cu acid lipoteicoic, funcționează ca liganzi la epiteliul orofaringian.

Toxinele sunt exotoxine proteice: streptolizinele și eritrotoxina.

Streptolizinele. Streptolizina S, oxigenstabilă, determină β -hemoliză pe plăcile cu geloză-sânge incubate aerob și nu este antigenică. Streptolizina O, oxigenlabilă, este antigenică.

Streptolizinele rup membranele biologice și eliberează enzimele lizozomale. Streptolizina O are acțiune leucotoxică, cardiotoxică și este letală după inoculare intravenoasă la animale de experiență.

Eritrotoxina, produsă de tulpini lizogene de *S. pyogenes*, determină criteumul scarlatinus. Are trei tipuri antigenice, A (produs de cca 80% dintre tulpini), B și C, care nu imunizează încrucișat.

Agresinele streptococice sunt:

— **hialuronidaza**, care favorizează invazivitatea streptococilor piogeni;

— **streptokinaza**, o fibrinolizină;

— **streptodornaza**, o ADN-ază cu patru forme antigenice distincte — A, B, C și D —, care pot fi produse de aceeași tulpină, dar predominant este produsă streptodornaza B.

Echipamentul de patogenitate al altor streptococi este mai redus. Astfel de pneumococi au numai capsulă polizaharidică, produc pneumolizină (asemănătoare streptolizinei O), neuraminidază și hialuronidază.

16.1.4. Receptivitatea la infecțiile streptococice

Receptivitatea la infecțiile cu streptococii piogeni grup A, C, G este generală.

Față de infecții cu alți streptococi receptivitatea este condiționată. Spre exemplu:

- Receptivitatea aparatului respirator la infecțiile pneumococice este legată de deficiențe ale mecanismului de eliminare bacteriană prin transportul mucociliar (viroze respiratorii, inhalare de gaze iritante etc.).

- Foarte receptivi la infecțiile cu streptococi grup B sunt nou-născuții, dar numai adulții imunocompromiși fac infecții cu acești streptococi.

- Receptivitatea la endocarditele subacute cu streptococi viridans sau enterococi este determinată de pre existența unor valvulopatii cardiace.

16.1.5. Infecții și boli streptococice

16.1.5.1. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes este o bacterie strict patogenă responsabilă de numeroase îmbolnăviri:

- *Cu poartă de intrare respiratorie:* faringite și angine, care se pot complica prin propagarea infecției din aproape în aproape (flegmon amigdalian, celulita planșeului bucal, sinuzite, otite medii, mastoidite cu posibilă invazie meningeană; propagarea infecției la căile respiratorii inferioare este rară și numai în condițiile afectării transportului mucociliar prin viroze respiratorii) sau pe cale limfatică (adenite laterocervicale). *Scarlatina* are cel mai frecvent poartă de intrare respiratorie, dar, în condiții de promiscuitate, poate avea și alte porți de intrare cum sunt: plăgile, mucoasa uterină.

- *Cu poartă de intrare cutanată:* impetigo sau piodermita streptococică (bubele dulci), determinate frecvent în asociație cu *Staphylococcus aureus*, erizipelul, infecții ale plăgilor care evoluează cu celule, fasciite.

- *Cu poartă de intrare genitală:* infecția uterină post-partum (febra puerperală).

Infecții streptococice invazive, care pot evolua septicemic, sunt febra puerperală; celulitele, fasciitele și erizipelul. În cursul septicemiilor, *S. pyogenes* determină localizări endocardice — endocardite supra acute.

Din 1993 în Vestul Europei se înregistrează cazuri de infecții streptococice agresive (fasciite necrozante ș. a.) cu evoluție septicemică, șoc toxic și letalitate mare. Tulpinile de *S. pyogenes* implicate sunt înzestrate cu un vast echipament toxicoenzimatic de patogenitate, cu rezistență transmisibilă la eritromicină și alte macrolide. Aparțin mai frecvent serovarurilor M1/T1, M3, M5, T3, T4, T13 etc.

Bolile poststreptococice grave sunt: reumatismul cardioarticular acut, glomerulonefrita acută, coreea, eritemul nodos.

Streptococii grup C și G determină infecții asemănătoare cu *S. pyogenes*.

16.1.5.2. *Infecțiile cu streptococi grup B*

Aceste infecții evoluează foarte grav la nou-născuți ca pneumonii septicemice sau meningite. La adulții imunocompromiși sunt rar cauză de endocardite, meningite, infecții puerperale.

16.1.5.3. Infecțiile pneumococice

Proporția purtătorilor sănătoși nazofaringieni de *S. pneumoniae* poate să ajungă până la 70%. Cauzează frecvent otite medii și sinuzite acute. Este cea mai frecventă cauză a pneumoniilor lobare acute. Determină relativ frecvent meningite, iar la fetele poate determina pelvipertonite primitive. Este implicat în etiologia ulcerului corneea serpiginos.

16.1.5.4. Streptococii viridans și enterococii

Streptococii viridans și enterococii sunt cea mai frecventă cauză a endocarditelor subacute. Mai pot fi implicați și în infecții mixte periapicale dentare, supurații pulmonare și, respectiv, infecții biliare sau, la femei, pelvine.

16.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR STREPTOCOCICE

16.2.1. Diagnosticul microbiologic

16.2.1.1. Prelevate patologice

În raport cu boala se recoltează pentru examinare:

- Hemoculturi repetate în infecțiile bacteriemice (endocardite subacute) sau septicemice.

- Exsudat oro- sau nazofaringian, puroi, lichid cefalorahidian, raclat uterin, spută în infecțiile localizate, recoltate, după caz, pe tampon, cu seringă sau pipeta. Dacă nu sunt examinate în 1—2 ore, trebuie însămânțate în bulion cu cristal violet și azid de sodiu, care funcționează atât ca mediu de conservare-transport, cât și ca mediu de îmbogățire pentru prelevatele contaminate.

16.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă a frotiurilor din puroi, lichid cefalorahidian, spută, exsudate, colorate Gram și cu albastru de metilen, depistează coci grampozitivi dispuși în perechi sau lanțuri în context inflamator cu polimorfonucleare.

Microscopia exsudatelor faringiene nu este uzuală din cauza prezenței permanente la acest nivel a streptococilor comensali, dar poate orienta corect diagnosticul în suspiciunea difteriei, candidozei și anginelor ulceronecrotice fusospirochetozice.

16.2.1.3. Izolarea și identificarea

Hemoculturile. *Etapa I.* Sângele în cantitate de 5—10 ml, recoltat aseptice din vena cubitală, este însămânțat în proporție de 1:10 în bulion glucozat și în bulion Kitt-Tarrozzi cu incubare de 7—21 zile la 37°C aerob și, respectiv, anaerob în atmosferă cu 10—20% CO₂.

Etapa II. Hemoculturile se examinează în zilele 1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 21 microscopic și prin repicare pe plăcă cu geloză-sânge.

Etapa III. Identificarea izolatelor în cultură pură se face prin:

Tabelul 16.1. Caracterile diferențiale ale speciilor de *Streptococcus* și *Enterococcus*

Specie	Habitat principal	Grup antigenic	Serovaruri	Timpul hemolizei	Fibrinolizină
<i>S. pyogenes</i>	Om	A	58	β	+
<i>S. agalactiae</i>	Bovine, om	B	4	β (NH, α)	—
<i>S. equisimilis</i>	Om	C	8	β	+
<i>S. equi</i>	Cabaline	C	1	β	—
<i>S. pneumoniae</i>	Om, animale	—	83	α	—
<i>S. salivarius</i>	Om	—, K	2	NH	—
<i>S. lactis</i>	Lapte și derivate	N	1	NH	—
<i>S. cremoris</i>	Lapte și derivate	N	1	NH	—
<i>E. faecalis</i>	Om	D	11	NH, β	—
<i>E. faecium</i>	Om	D	19	α , NH	—
<i>E. bovis</i>	Bovine	D	20	NH (α)	—

Simboluri: \leftrightarrow — 90% sau mai multe din tulpini pozitive; \leftarrow — 90% sau mai multe din tulpini negative; (+) — la hemoliză, reacție mai rar întâlnită, iar la testele fiziologice, reacție slab pozitivă sau

■ **Examenul caracterelor de cultură.** Streptococii sunt pretențioși nutritiv, facultativ anaerobi, cultivă numai pe medii îmbogățite. Pe geloză-sânge formează colonii mici, transparente β -, α -, α -prim hemolitice sau nehemolitice în funcție de specia implicată.

■ **Microscopie:** coci grampozitivi așezați în lanțuri. Uneori așezarea caracteristică în lanțuri nu se observă și predomină coci izolați sau în perechi, ceea ce face dificilă diferențierea de micrococi. Testul catalazei diferențiază aceste bacterii fiind negativ pentru streptococi și pozitiv pentru micrococi.

■ **Testul catalazei.** Pe o lamă de microscop, se amestecă o picătură din cultura în bulion glucozat cu o picătură din soluția 10% de H_2O_2 . Se urmărește efectul timp de 1—3 minute. Test negativ: absența bulelor de gaz; test pozitiv: apariția bulelor de gaz.

■ **Determinarea serogrupului** o facem cu seruri de referință de grup A, B, C, D, F și G prin reacțiile de precipitare inelară, latex-aglutinare sau coaglutinare.

■ **Testul de sensibilitate la bacitracină.** Pe un sector al unei plăci cu geloză-sânge însămânțat confluent cu tulpina testată se depune un microcomprimat cu 0,5 UI bacitracină și se incubează peste noapte la 37°C. O zonă de inhibiție cu diametrul peste 10 mm indică sensibilitatea la bacitracină. Prezumtiv, streptococii sensibili la bacitracină sunt grup A, cei rezistenți nongrup A.

■ **În scopuri epidemiologice** se procedează la identificarea serovarurilor M sau T de *S. pyogenes*.

Creștere la			Creștere în mediu cu				Toleranța 30 minute la 60°C
10°C	45°C	50°C	Lapte cu 0,1% albastru de metilen	pH 9,6	NaCl 6,5%	Bilă 40%	
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	+	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	d	—	—	—	—	—	—
+	—	—	+	—	—	+	V+
+	—	—	(+)	—	—	+	V+
+	+	—	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+
—	+	—	—	+	—	+	+

d — 11—89% din tulpini pozitive; V+ — tulpini uzual pozitive; NH — tulpini nehemolitice; întârziată. La rubrica «Grup antigenic» simbolul «—» semnifică nongrupabil.

■ *Identificarea streptococilor nongrup A* se face prin criteriile Sherman (tabelul 16.1).

■ *Pentru identificarea S. agalactiae* (grup B) este util testul CAMP, bazat pe capacitatea acestei specii de a stimula activitatea hemolitică a streptococului auriu. Pe o placă cu geloză-sânge însămânțăm tulpinile de streptococ testate în striuri perpendiculare până la 1 cm distanță de un striu preînsămânțat cu *Staphylococcus aureus* și incubăm până a doua zi la 37°C. Zona de hemoliză a stafilococului se lărgește în dreptul striului de streptococ grup B.

Etapa IV. Comunicăm rezultatul: specia sau grupul serologic al streptococului izolat. *S. pyogenes* este printre puținele specii care și-au păstrat marea sensibilitate naturală la penicilină. Pentru toți ceilalți streptococi se efectuează și se comunică antibiograma. În cazul pacienților sensibilizați la penicilină, la fel se procedează și cu *S. pyogenes*, care a dobândit rezistență la alte antibiotice, inclusiv la eritromicină.

Exsudate nazo- și orofaringiene, puroi, spută și alte exsudate. *Etapa I.* Se epuizează prelevatul patologic pe o placă cu geloză-sânge. Pentru exsudatele contaminate care nu au fost transportate în mediul de conservare-îmbogățire, este mai indicată epuizarea pe geloză-sânge cu 1:500000 cristal violet (inhibitor al florei grampozitive asociate) sau cu azidă de sodiu (inhibitor al florei gramnegative). Se incubează cultura peste noapte la 37°C. Incubarea în atmosferă cu 5—10% CO₂ favorizează izolarea streptococilor proveniți din cavități închise sau semiînchise (puroi sinuzal, otic, mastoidian).

Etapa II. Se aleg coloniile mici, transparente β-hemolitice, iar din alte prelevate

decât cele faringiene și coloniile α -, α -prim-hemolitice sau nehemolitice și se repică 3—4 colonii bine izolate în bulion glucozat sau bulion ser, pentru acumulare de cultură pură după incubare peste noapte la 37°C.

Etapa III. Se identifică izolatele prin studiul caracterelor microscopice, proba catalazei, structura antigenică, caracterele biochimice și se efectuează antibiograma.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză, precizând: serogrupul sau specia de streptococ și rezultatul antibiogramei (vezi precizările de la hemocultură).

16.2.2. Diagnosticul imunologic

Examenul serologic este util la pacienții suspecți de boli poststreptococice prin depistarea titrului semnificativ al antistreptolizinei O (ASLO) peste 200 U/ml, antihialuronidazei (AH-dază) peste 350 U/ml, antistreptodornazei B (ADN-ază B) peste 240 U/ml, antistreptokinazei peste 160 U/ml, creșteri care apar după 7—12 zile de la episodul infecțios streptococic.

Determinarea antistreptolizinei O (testul ASLO) are la bază neutralizarea streptolizinei O standardizată de către anticorpii din serul studiat.

Reacția se efectuează în două etape:

- La diluții ale serului examinat se adaugă o cantitate determinată de streptolizină O activată (prin reducere cu cisteină) și se incubează tuburile timp de 15 minute la 37°C pentru realizarea reacției antigen-anticorp.

- Ulterior, în toate tuburile se adaugă, ca indicator pentru neutralizarea streptolizinei O, o suspensie de hematii de iepure și după 45 minute de incubare la 37°C se face o apreciere prealabilă a titrului ASLO. Citirea definitivă se efectuează după menținerea tuburilor peste noapte la +4°C. Titrul exprimat în unități ASLO este indicat de ultima diluție a serului care inhibă liza hematiilor.

Pentru *diagnosticul scarlatinei* sunt utile *reacțiile imunologice de neutralizare*:

- *Reacția Schultz-Charlton* (fenomenul de stingere a erupției scarlatinoase). Are la bază neutralizarea eritrotoxinei cu dispariția locală în 18—24 ore a eritemului scarlatinos sub acțiunea serului antiscarlatinos (antitoxinei) injectat intradermic în volum de 0,2 ml. Dacă eritemul persistă, are altă etiologie.

- *Reacția Dick* depistează prezența anticorpilor antieritrotoxină. Pe fața anterioară a antebrațului se injectează o doză reactivă cutanată de eritrotoxină purificată în volum de 0,1 ml, iar la antebrațul opus, ca martor, același volum de eritrotoxină inactivată termic. Reacția se citește după 24 ore. Reacția pozitivă, eritem local cu diametrul mai mare de 10 mm, indică lipsa antieritrotoxinei (persoană receptivă la scarlatină). Reacția negativă, absența eritemului la locul de inoculare, indică prezența antieritrotoxinei (persoană imună la scarlatină). La martor eritemul trebuie să fie absent.

16.2.3. Biopreparate și antibiotice pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul infecțiilor streptococice

- Ser imun antiscarlatinos.
- Streptodornază B.
- Toxină Dick.
- Streptokinază.
- Streptolizină O.
- Antibiotice: penicilină, eritromicină etc. Rondele cu 0,5 U bacitracină.
- Streptohialuronidază.

16.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR PNEUMOCOCICE

16.3.1. Diagnosticul microbiologic

16.3.1.1. Prelevate patologice

Prelevatele patologice sunt în raport cu localizarea infecției: spută, exsudate din seroase, sânge, puroi, lichid cefalorahidian.

16.3.1.2. Microscopia directă

Pe frotiurile din spută, puroi, lichid cefalorahidian colorate Gram și cu albastru de metilen se observă coci grampozitivi ovali sau lanceolați, așezați în perechi sau lanțuri și capsulați în contextul unei reacții inflamatorii cu leucocite polimorfonucleare. Pe frotiurile din spută pneumococii au semnificație clinică atunci când apar asociați leucocitelor și filamentelor de fibrină în cantitate mai mare de 6—8 perechi în medie pe câmp microscopic.

Microscopia directă permite determinarea serovarului de pneumococ prin *reacția Neufeld de umflare a capsulei* sau prin *reacția Sebin de microaglutinare și umflare a capsulei*. Pe o lamă de microscop se amestecă o picătură de spută cu o picătură din serurile antipneumococice polivalente, apoi cele monovalente corespunzătoare, și o ansă din soluția colorantă de albastru de metilen, după care se acoperă cu o lamelă și se examinează. Pe preparatul în care serul imun corespunde serovarului, pneumococii apar cu capsula mult mărită, umflată (testul Neufeld) sau se constată aglutinarea pneumococilor cu capsula mărită de volum (testul Sebin).

16.3.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Din spută, aspirat traheal sau spălătură bronșică pneumococii sunt izolați cantitativ prin epuizarea a 0,1 ml din diluțiile 10^{-2} și 10^{-3} pe câte o placă cu geloză-sânge și geloză-ciocolată și incubare peste noapte la 37°C în atmosferă cu 10—20 CO_2 . Pentru efectuarea corectă a diluțiilor, probele sunt în prealabil omogenizate prin tratare cu soluție 0,5% de *N*-acetil-*L*-cisteină.

Din prelevatele necontaminate (puroi etc.) izolarea se face prin simpla epuizare a probei pe o placă cu geloză-sânge și incubare în condițiile precizate mai sus.

Coloniile de *S. pneumoniae* sunt α -hemolitice, mici, transparente, de tip S sau mucoide. Caracteristic, datorită autolizei, centrul coloniilor se deprimă. Tulpinile nepatogene formează colonii R.

Etapa II. Se repică pe pantă de geloză-ser câteva colonii caracteristice, bine izolate, pentru acumulare de cultură pură după incubarea peste noapte în atmosferă cu CO_2 .

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

- *morfotinctoriale*: diplococi ovali sau lanceolați grampozitivi;

■ *de cultivare*: bacterie exigentă nutritiv, nu crește pe medii simple; formează colonii mici α -hemolitice cu tendință la autoliză;

■ *biochimice*: sunt lizați în prezența bilei sau sărurilor biliare (testul de biloliză), fermentează inulina pe mediul Hiss, sunt sensibili la optochin (testul de sensibilitate la optochin: zonă de inhibiție de cel puțin 15 mm în jurul rondelilor cu 5 μ g optochin plasate pe o arie însămânțată complet cu tulpina de identificat);

■ *structura antigenică*: aglutinare cu seruri imune polivalente («Omniserum») și monovalente specifice de tip;

■ *antibiograma*.

Etapa IV. Se analizează rezultatele testelor de identificare și se completează buletinul de analiză: e. g. din spută am izolat *S. pneumoniae* în cantitate de peste 10^6 UFC/ml, serovar ..., datele antibiogramei.

O metodă simplă de izolare și identificare a pneumococilor virulenți din prelevate intens contaminate (e. g. spută) este injectarea intraperitoneală la șoarece a 0,5 ml prelevat. Pneumococii virulenți determină o infecție septicemică mortală în 24—48 ore și, la necropsia animalelor, pot fi reizolați în hemocultură prelevată din cord sau observați microscopic pe amprente din splină.

16.3.2. Biopreparate și antibiotice folosite pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și terapia infecțiilor pneumococice

■ Seruri imune polivalente și monospecifice de tip pentru identificarea antigenică.

■ Vaccinuri polizaharidice purificate preparate din tulpini ale serovarurilor izolate din regiune.

■ Antibiotice: penicilină G, ampicilină, eritromicină, biseptol etc.

■ Rondelile cu 5 μ g optochin (etilhidrocupreină).

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE NEISSERII

17.1. DATE GENERALE

17.1.1. O minidefiniție

Genul *Neisseria* reunește diplococi gramnegativi, asemănători boabelor de cafea, catalazo- și oxidazopozitivi, strict aerobi, care atacă zaharurile oxidativ.

17.1.2. Repere taxonomice

Familia *Neisseriaceae* include patru genuri: *Neisseria*, *Moraxella* (cu subgenurile *Moraxella* și *Branchamella*), *Acinetobacter* și *Kingella*, care reunesc specii patogene, condiționat patogene și saprofite nepatogene, constant prezente în microflora căilor respiratorii superioare.

După exigențele nutritive și patogenitate, în genul *Neisseria* diferențiem două grupe de specii: neisseriile «pretențioase» și neisseriile «nepretențioase».

■ Neisserii «pretențioase» sunt cele două specii patogene ale genului: *N. meningitidis* și *N. gonorrhoeae*, foarte fragile în mediul extern. Sunt carboxifile și cultivă numai la 37°C, numai pe medii special îmbogățite. Formează colonii nepigmentate.

■ Neisseriile «nepretențioase» sunt specii condiționat patogene sau nepatogene ale genului, care cultivă pe medii simple, chiar la 22°C. Majoritatea formează colonii pigmentate, mai frecvent în galben: *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flavescens*, *N. mucosa* (cu colonii mucoide, nepigmentate) ș. a.

Moraxella (Branchamella) catarrhalis este o specie microscopic asemănătoare neisseriilor, nepretențioasă nutritiv și nezaharolitică, găzduită în căile respiratorii superioare și condiționat patogenă.

17.2. NEISSERIA MENINGITIDIS

17.2.1. Date generale

17.2.1.1. Habitat

N. meningitidis parazitează specific omul și are tropism accentuat pentru nazofaringe. Rata portajului în colectivitatea generală este de 5—30% și crește până la 70—80% în

conjunctură epidemică. De la acest nivel ar putea contamina mediul ambiant prin secreții nazofaringiene, dar fiind foarte fragilă la uscăciune și refrigerare, zona periculoasă de contaminare se limitează la 2—3 m în jurul pacientului sau purtătorului (prin picături Flüge), sau la obiecte imediat după contaminarea lor cu conținut nazofaringian.

17.2.1.2. Factori de patogenitate

Fimbriile meningococilor funcționează ca liganzi la mucoasa nazofaringiană. *Cap-sula*, factor esențial de virulență, îi face rezistenți la acțiunea bactericidă nespecifică a serului. În cursul creșterii meningococilor hipersinteza de membrană externă generează numeroase vezicule, care se desprind de coci și determină *endotoxemie*. Endotoxina meningococilor are lipidul A și miezul polizaharidic identic cu ale enterobacteriaceelor. Rolul, eventual patogen, al *proteazelor IgA* produse de meningococi rămâne încă neclar.

17.2.1.3. Receptivitatea la infecțiile meningococice

Portajul nazofaringian la meningococi este imunizant. Meningococii virulenți determină infecții sistemice numai la persoane lipsite de anticorpi bactericizi față de antigenii de înveliș ai tulpinii invadante. Bacterioliza fiind complement dependentă, *pacienții deficienți în componentele C3, C6—8 ale sistemului complement sunt foarte receptivi și fac infecții meningococice repetate.*

17.2.1.4. Infecțiile meningococice

Portajul nazofaringian de meningococi este în fond o infecție inaparentă. Numai la cca 1 din 1 000 de infectați apare o infecție majoră manifestată ca meningită, septicemie fulminantă (sindromul Friederichsen-Waterhouse, care evoluează mortal în 6—8 ore) sau ca meningococcemie cronică cu localizări articulare sau pericardice. Caracteristic meningococcemiilor este o erupție cutanată purpurică, polimorfă. Mai rar meningococii determină infecții bronhopulmonare sau uretrite.

17.2.2. Investigația etiologică a infecțiilor meningococice

17.2.2.1. Diagnosticul microbiologic

17.2.2.1.1. Prelevate patologice

Prelevatele patologice sunt în raport cu forma clinică a infecției: tampon nazofaringian de la purtători și de la bolnavi; hemoculturi, exsudat prelevat aseptice prin scarificarea peteșilor; lichid cefalorahidian prelevat strict aseptice în 2 eprubete: cca 2 ml pentru citologie (cantitativă și calitativă), bacterioscopie și examen biochimic, iar cca 2 ml pentru însămânțări.

Data fiind fragilitatea mare a meningococilor, toate probele vor fi examinate imediat (cel mult timp de 1—2 ore) și se va evita cu desăvârșire refrigerarea.

Precizăm că meningitele sunt infecții polietologice: unele sunt bacteriene: *N. meningitidis* (mai rar unele neisserii «nepretențioase», ca *N. subflava*, *N. flavescens*, iar uneori chiar gonococii), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, streptococi,

Staphylococcus aureus, *Enterobacteriaceae*, bacil piocianic, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leptospira* etc.; altele sunt virale: enterovirusuri, virusul parotiditei, virusul herpes simplex, arbovirusuri etc.

Diferențierea meningitelor bacteriene de cele virale este o urgență, pentru că primele evoluează întotdeauna grav și beneficiază de tratament antimicrobian. Meningitele virale, deși nu beneficiază de tratament antiviral (în majoritatea lor), cele mai multe sunt benigne. De aceea, paralel cu diagnosticul microbiologic clasic, se recurge la metode rapide de diferențiere a meningitelor prin examenul citologic și biochimic al lichidului cefalorahidian (tabelul 17.1) examene ale sângelui (leucograma și formula leucocitară, viteza de sedimentare a hematiilor, dozarea proteinei C reactive).

Tabelul 17.1. Indicii examenului citologic și biochimic ai lichidului cefalorahidian în meningite

Categorie	Aspectul L.C.R.	Examen microbiologic	Examen citologic	Examen biochimic, mg/dl			
				proteine	glucoză	acid lactic	cloruri
L.C.R. normal	Clar, incolor	Steril	0—3 limfocite/mm ³	15—40	50—70	35	680—730
Meningite bacteriene acute	Opalescent, purulent (hematic)	Depistare rapidă (microscopică, antigenică); izolare	Cel mai frecvent >1 000 polimorfonucleare/mm ³	>100	<40	>35	
Meningită tuberculoasă	Clar sau ușor opalescent cu vâl de fibrină	-	≥200 limfocite/mm ³	>100	<40	>35	<600
Meningită micotică	Clar sau opalescent	-	100—500 limfocite/mm ³	>100	<40	Alcool etilic prezent	
Meningite virale	Clar sau opalescent	Steril bacteriologic; se poate izola virusul	Cca 500—1000 limfocite/mm ³	15—100	50—70	35	680—730

17.2.2.1.2. Microscopia directă

Din lichidul cefalorahidian ca atare (probele purulente) sau din sedimentul obținut prin centrifugare (probele opalescente sau clare) efectuăm frotiuri pe care le colorăm cu albastru de metilen (pentru citologia calitativă și bacterioscopie), Gram (pentru detalii bacterioscopice) sau Ziehl-Neelsen (în suspiciunea meningitei tuberculoase). În contextul unei reacții inflamatorii cu polimorfonucleare, meningococii apar ca diplococi «în boabe de cafea», gramnegativi dispuși extra- sau intracelular. Bacterioscopia lichidului cefalorahidian este orientativă, pentru că nu diferențiază speciile aceleiași categorii microscopice, uneori rămânând negativă, chiar în meningite bacteriene.

Meningococii mai pot fi urmăriți pe frotiurile serozității obținute prin scarificarea peteșilor sau în exsudatul articular de la bolnavi cu artrite.

17.2.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Prelevatele patologice sunt însămânțate pe medii preîncălzite la 37°C: geloză-sânge, geloză-ciocolată sau alte medii special îmbogățite pentru neisseriile «preten-

joase» cum sunt mediile HYL (geloză îmbogățită cu hemină sau sânge lacat de cal, extract de levură și ficat) ori mediul Thayer-Martin, iar culturile incubate 24—48 ore la 37°C în atmosferă cu 5—10% CO₂.

Exsudatul nazofaringian este epuizat pe mediul preparat selectiv prin adaos de ristomicină 20 U/ml, vancomicină sau lincomicină 5—7 U/ml (pentru inhibarea creșterii bacteriilor grampozitive).

Hemoculturile se însămânțează în bulion glucozat (un volum sânge pentru 10 volume mediu) și se incubează 1—10 zile cu repicări pe geloză-sânge la intervale de 1; 2; 3; 5; 7; 10 zile.

Din lichidul cefalorahidian necentrifugat se însămânțează volume de cca 1 ml în bulion glucozat și în bulion cu factorii de creștere X și V (pentru izolarea *Haemophilus influenzae*).

Etapa II. Se examinează culturile urmărind coloniile suspecte de neisserii. Meningococii formează colonii S, transparente, iar neisseriile comensale colonii pigmentate sau nepigmentate (tabelul 17.2).

Tabelul 17.2. Caractere de diferențiere ale neisseriilor

Specii	Colonii: pigment galben	Scindare					Reducere	
		glucoză	maltoză	lactoză	zaharoză	fructoză	NO ₂	NO ₃
<i>N. meningitidis</i>	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>N. gonorrhoeae</i>	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	+	—	—	—	+
<i>N. subflava</i>	+	+	+	—	V	V	—	+
<i>N. flavescens</i>	+	—	—	—	—	—	—	+
<i>N. mucosa</i>	V	+	+	—	+	+	+	+
<i>N. sicca</i>	V	+	+	—	+	+	—	+
<i>M. catarrhalis</i>	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>S. pneumoniae</i>	—	+	+	+	+		—	—

Simboluri: ↔ — pozitiv; ← — negativ, V — variantă

Repicarea pentru cultura pură se face din coloniile care dau testul citocrom-c oxidazei pozitiv. Această testare este esențială pentru izolatele din exsudatul nazofaringian și facultativă pentru izolatele din prelevate necontaminate. Pe coloniile suspecte se depune o picătură din soluția de dimethyl- sau tetramethyl-*para*-phenilendiamină. Oxidaza este prezentă dacă în interval de cca 20 secunde colonia se colorează în roz-roșu, respectiv în albastru. Imediat după apariția culorii, coloniile trebuie repicate.

Etapa III. Se identifică izolatele prin:

■ **Studiul caracterelor morfotinctoriale:** diplococi gramnegativi «în boabe de cafea»; în culturile vechi apar forme atipice variate.

■ **Studiul caracterelor de cultură** prin repicare pe geloză nutritivă și geloză-ser cu incubare la 37°C și la 22°C. Meningococul crește numai pe geloză-ser la 37°C.

■ **Studiul caracterelor biochimice.** Meningococii produc oxidază și catalază, iar pe mediul Hiss formează acid din glucoză și maltoză, dar nu scindează zaharoza, lactoza și fructoza (tabelul 17.2).

■ *Identificarea antigenică.* Polizaharidele capsulare impart meningococii in patru grupe majore: A, B, C, D și in grupele adiționale X, Y, W135, Z și Z', care pot fi identificate prin reacții de aglutinare cu seruri specifice de grup. Există și tulpini negrupabile.

Infecțiile cu meningococi grup A și C pot evolua epidemic, cu vârfuri ale prevalenței, la intervale de 8—12 ani. Meningococii celorlalte grupe determină mai ales infecții sporadice.

■ *Antibiograma*

Etapa IV. Se interpretează rezultatele testelor de identificare, rezultatul antibiogramei și se completează buletinul de analiză. De exemplu, «Din exsudatul nazofaringian am izolat *N. meningitidis*, serogrup» sau «Din lichidul cefalorahidian am izolat *N. meningitidis* serogrup A» etc.

17.2.2.1.4. Depistarea antigenilor meningococici

Este foarte utilă pentru diagnosticul rapid al meningitelor. Putem recurge la reacția de precipitare prin contraimmunoelectroforeză, specifică, dar puțin sensibilă, sau la reacții mai sensibile de coaglutinare sau latex-aglutinare.

17.2.2.2. *Diagnosticul serologic*

Are valoare redusă. Putem depista și titra anticorpii antimeningococici în serul purtătorilor sau bolnavilor prin reacții de aglutinare cu suspensii meningococice de referință (titrul semnificativ mai mare sau egal cu 1:160) ori hematii sensibilizate cu antigeni polizaharidici de grup (titrul semnificativ 1:80 la purtători și nu mai puțin de 1:160 la bolnavi).

17.2.2.3. *Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul infecțiilor meningococice*

- Seruri imune de grup: A, B, C, D, X, Y, W135, Z, Z'.
- Suspensii meningococice de grup, hematii sensibilizate cu antigeni polizaharidici de grup.
- Antibiotice: penicilină G, ampicilină, cloramfenicol, rifampicină etc.

17.3. NEISSERIA GONORRHOEAE

17.3.1. Date generale

17.3.1.1. *Habitat*

Gonococii parazitează specific omul și se remarcă prin tropismul deosebit pentru uroepiteliu. Foarte fragili în mediul ambiant, s-au adaptat la transmiterea pe cale sexuală. Transmiterea prin lenjeria intimă foarte recent contaminată cu puroi uretral este posibilă în condiții de promiscuitate.

17.3.1.2. Factori de patogenitate

Inițial, atașarea gonococilor la epiteliul uretral este asigurată de *fimbrii*. Ulterior o *adezină proteică din membrana externă* a bacteriei asigură aderența intimă la receptori membranari și inițiază endocitarea gonococilor de către uroepiteliu. Un *chelator de fier* le asigură înmulțirea în condițiile feriprive de pe mucoasa infectată. *Capsula, proteinele și lipopolizaharida (endotoxina)* le conferă rezistență la acțiunea bacteriostatică și litică a anticorpilor și celulelor gazdei.

17.3.1.3. Receptivitatea la infecțiile gonococice

Receptivitatea la infecțiile gonococice este generală.

17.3.1.4. Infecțiile gonococice

La *bărbat* gonococii determină uretrite cu periuretrită, iar pe cale limfatică infecția se propagă la prostată și epididim.

La *femeie* gonococii pot infecta uretra, glandele Skene și Bartholin, dar mai frecvent infecția se localizează în endocervix cu extindere la endometru, trompele uterine, ovare și peritoneul pelvin (principală cauză a anexitelor cronice care duc la sterilitate feminină).

După raporturi sexuale aberante infecția gonococică afectează inițial rectul sau nazofaringele.

Indiferent de localizarea inițială, infecția gonococică poate evolua bacteriemic cu localizări metastatice articulare, cutanate, meningiene sau endocardice.

Infecția gonococică poate evolua și inaparent, mai frecvent la femei (cca 50%), mai rar la bărbați (5—10%).

Nou-născutul contaminat în canalul de naștere face inițial o conjunctivită gonococică cu extindere rapidă a infecției la tot globul ocular: oftalmia gonococică. La *fetițe*, lipsite de bariera acidă vaginală, gonococul determină vulvovaginite, forme de infecție care nu se întâlnesc la femeia matură.

Fără tratament antimicrobian adecvat infecțiile gonococice nu se vindecă, ci evoluează spre cronicizare cu distrugerii tisulare (stricturi uretrale, ale trompelor uterine, distrugerii articulare).

Este important de reținut că în condiții de promiscuitate sexuală o dată cu gonoreea se pot transmite sifilisul, infecțiile cu *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* și, mai grav, infecția cu virusul imunodeficienței umane. De aceea pacienții diagnosticați cu gonoree, boală cu perioadă de incubație mai scurtă, trebuie ținuți sub observație și pentru eventualitatea celorlalte boli cu transmitere sexuală, care au tratament diferit de al gonoreei.

17.3.2. Investigația etiologică a infecțiilor gonococice

17.3.2.1. Diagnosticul microbiologic

17.3.2.1.1. Prelevate patologice

Prelevatele patologice sunt în raport cu localizarea și forma clinică a infecției: puroi uretral, exsudat endocervical, vulvovaginal, anorectal, conjunctival, nazofaringian, articular.

Recoltarea se face, după natura probei, cu ansa, cu tamponane, prin puncție și aspirație articulară.

În formele cronice de gonoree probele se recoltează după stimularea secreției sau inflamației din focarele de infecție prin diferite metode: masajul prostatei (stimulare mecanică), administrare de vaccin omorât (stimulare biologică), diatermie sau inductotermie (ședințe de 15—30 minute, timp de 3 zile consecutiv). La femei se recomandă recoltarea secrețiilor endocervicale în timpul și la sfârșitul menstruelor.

Data fiind extrema fragilitate a gonococilor în mediul extern, personalul va fi instruit să execute extemporaneu (fie în spital, fie în laborator) frotiurile și însămânțarea prelevatelor pe mediile de cultură preîncălzite la 37°C.

17.3.2.1.2. Microscopia directă

Pe frotiurile colorate cu albastru de metilen sau, cu muftă atenție, Gram, în formele acute se observă o reacție inflamatorie intensă cu polimorfonucleare intacte morfologic. Numeroși diplococi gramnegativi «în boabe de cafea» burează citoplasma unor fagocite, pot fi observați și extracelular. Pe frotiu se mai pot observa: celule epiteliale, mucus, trichomonade (în infecțiile mixte), alte microorganisme (coci, bacili).

În contextul uretritei purulente acute la bărbați, acest tablou microscopic pune diagnosticul de uretrită gonococică rapid și cu eficiență de cca 98%.

Prezența pe frotiu numai a polimorfonuclearelor intacte în număr mare, alături de cozinofile și de numeroase celule epiteliale descuamate, în absența diplococilor tipici cu dispoziție intracelulară indică necesitatea unor examene repetate.

La femei, la copii și în infecțiile cronice sau asimptomatice, citobacterioscopia are numai o valoare orientativă și se impune izolarea și identificarea gonococului.

17.3.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Prelevatele patologice sunt epuizate pe medii special îmbogățite (HYL, Thayer-Martin etc.). Pentru izolarea din prelevate contaminate (tampon rectal, exsudat nazofaringian etc.) în mediul de cultură se include și un amestec selectiv format din colimicină sau polimixină B 10—20 U/ml (inhibă bacili gramnegativi) și ristomicină sau vancomicină ori lincomicină (inhibă flora grampozitivă). Culturile trebuie incubate 24—48 ore la 37°C în atmosferă cu 5—10% CO₂ și umiditate crescută asigurată prin includerea în exsicatorul sau borcanul de incubare a unui vas cu apă sau hârtie de filtru umectată.

Etapa II. Coloniile suspecte (mici, transparente, S, oxidazopozitive) sunt repicate, pentru a obține cultura pură necesară identificării.

Etapa III. Se procedează la identificarea culturii pe baza următoarelor caractere:

- diplococi caracteristici gramnegativi;
- oxidazopozitivi;
- care cultivă numai la 37°C pe medii special îmbogățite cu ser;
- formează acid numai din glucoză și sunt inactivi asupra maltozei, lactozei și zaharozei (tabelul 17.2).

Identificarea antigenică poate fi făcută cu seruri antigonococice prin aglutinare, coaglutinare sau reacție imunofluorescentă.

Antibiograma este necesară pentru că există tulpini producătoare de β -lactamază și multirezistente la antibiotice.

Etapa IV. Interpretarea rezultatelor și completarea buletinului de analiză.

17.3.2.2. Diagnosticul serologic

Pentru diagnosticul infecțiilor gonococice cronicizate se recurge la RFC. Titrurile mai mari de 1:10 sunt sugestive, dar specificitatea și sensibilitatea reacției sunt nesatisfăcătoare.

17.3.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul infecțiilor gonococice

- Ser imun antigonococic, pentru identificarea antigenică a culturilor.
- Ser imun antigonococic fluorescent, pentru depistarea directă a gonococilor prin colorație imunofluorescentă.
- Vaccin omorât antigonococic, pentru terapie în formele cronice ale infecției.
- Antibiotice de elecție: peniciline, rifampicină etc.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BRUCELOZEI

18.1. DATE GENERALE

18.1.1. O minidefiniție

Brucelele sunt cocobacili gramnegativi imobili, nesporulați. Aerobi sau carboxifili. Catalazopozitivi, oxidazopozitivi sau negativi, ureazopozitivi. Pe mediul Hiss nu produc acid din zaharuri.

18.1.2. Reper taxonomice

Genul *Brucella* reunește 7 specii: *B. melitensis* (cu 3 biovaruri), *B. abortus* (cu 9 biovaruri), *B. suis* (5 biovaruri), *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis* și *B. rangiferi*. Dintre acestea primele trei specii sunt implicate ocazional în infecții umane.

18.1.3. Habitat

În natură brucelele parazitează diferite animale: *B. melitensis* este găzduită mai ales de caprine și ovine, *B. abortus* de bovine, *B. suis* de suine. La animale, în afara gestației, bruceloza evoluează latent sau ca infecție cronică, obișnuit asimptomatic. La masculi infecția se localizează frecvent în veziculele seminale. La femelele gestante infecția se reactivează și brucelele invadează placenta și țesuturile fetale, determinând avort. După avort infecția se localizează în glanda mamară cu eliminarea brucelelor timp îndelungat prin lapte. În mediul extern brucelele sunt organisme relativ rezistente.

18.1.4. Factori de patogenitate

Brucelele sunt bacterii facultativ intracelulare cu mari capacități sensibilizante. Produc endotoxină și au echipament enzimatic de invazivitate (hialuronidază).

18.1.5. Receptivitatea la infecție

Deși receptivitatea omului la bruceloză este generală, boala are mai mult caracter profesional, afectând îngrijitorii de animale și personalul veterinar. Sunt posibile imbol-

năviri ocazionale de consumul de lapte și derivate de lapte nepasteurizat de la animale bolnave.

18.1.6. Bruceloza umană

Contaminarea omului se produce pe variate căi: percutană, conjunctivală, respiratorie, digestivă. Leziunile determinate de brucele sunt de tip granulomatos. În infecția cu *B. melitensis* granulomul evoluează frecvent spre caseificare și supurație. Bruceloza evoluează septicemic, recidivant, cu febră ondulantă și afectarea sistemului reticuloendotelial (limfadenite), locomotor (artrite, poliartrite, bursite, artralгии), nervos (meningoencefalită, nevrite, radiculite etc.), organele genitale la bărbați (orhită, epididimită) și la femei (salpingită, ovarită, endometrite etc.), ficatul (eventual cu icter), rinichii (pielonefrită) etc.

În ansamblu, bruceloza determină un tablou clinic proteiform, dificil de recunoscut, cauzat de varietatea organelor afectate. Impune diferențierea de multe alte infecții cum sunt: infecțiile pulmonare acute, tuberculoza, febra Q, ornitoza, febra tifoidă, reumatismul etc.

18.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN BRUCELOZĂ

18.2.1. Diagnosticul microbiologic

18.2.1.1. Prelevate patologice

Examinăm, în raport cu stadiul bolii și cu forma clinică: hemoculturi, meduloculturi, biopsii ganglionare; mai rar: lichid cefalorahidian, exsudat articular, bilă, urină, puroi. De la animale examinăm avortonul.

18.2.1.2. Microscopia directă

Chiar pe preparate colorate imunofluorescent, microscopia directă este de cele mai multe ori negativă, din cauza numărului redus de brucele în prelevatele patologice din infecția umană.

18.2.1.3. Izolarea și identificarea

Izolarea și identificarea sunt rezervate laboratoarelor specializate, din cauza riscului infecției de laborator.

Etapa I. Însămânțăm medii de cultură speciale cu extract de ficat, geloză D, geloză îmbogățită cu eritritol. Probele contaminate (sediment urinar, lapte de la bovine, caprine etc.) sunt însămânțate pe medii selective (prin polimixină B, bacitracină, ciclohexidină). Culturile sunt incubate la 37°C în atmosferă cu 5—10% CO₂ (pentru a facilita izolarea de *B. abortus*) și urmărite 4—6 săptămâni. Izolarea prin injectare la cobai sau în oul embrionat de găină poate fi realizată în interval de 1—2 săptămâni.

Hemocultura se face prin însămânțarea a câte 5 ml sânge în două flacoane cu mediu bifazic (pantă de geloză și bulion reunite în același flacon; în poziția verticală a flaconului panta de geloză este descoperită și poate fi inundată cu bulion, pentru însămânțare, prin înclinarea flaconului). Hemoculturile sunt incubate la 37°C și urmărite timp de 5 săptămâni pentru apariția culturii. La fiecare 3—5 zile flacoanele sunt înclinate, pentru însămânțarea pantei de geloză prin inundare, și readuse la vertical. Una din hemoculturi este incubată în atmosferă cu 5—10% CO₂. Utilizarea mediului bifazic previne eventualele contaminări ale hemoculturilor clasice din cauza repicărilor frecvente necesare pe parcursul urmăririi lor.

Similar hemoculturii se urmărește și mediocultura.

Etapă II. Coloniile caracteristice, mici, S, transparente, incolore, sunt repicate pentru obținerea culturii pure necesare identificării.

Etapă III. Izolatele sunt identificate pe baza:

■ *Caracterelor microscopice:* cocobacili gramnegativi, imobili, necapsulați, nesporulați.

■ *Caracterelor de cultură:* creșterea pe medii special îmbogățite, necesitatea CO₂ etc.

■ *Caracterelor biochimice:* producerea de H₂S și urează, inactivitatea asupra zaharurilor în mediul Hiss.

■ *Activității bacteriostatice diferențiate a coloranților de anilină* (fucsină 1:25 000, tionină 1:50 000) — vezi tabelul 18.1.

Tabelul 18.1. Diferențierea principalelor specii de *Brucella*

Caractere studiate	<i>B. melitensis</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. suis</i>
Activitatea ureazei	Lentă	Foarte lentă	Foarte rapidă (1—5 minute)
Cultivarea în atmosferă fără CO ₂	+	Necesită CO ₂	+
Producerea de H ₂ S	—	+	±
Creștere pe medii cu coloranți:			
■ tionină	+	—	+
■ fucsină	+	+	—
Aglutinarea cu ser monospecific:			
■ anti-M	+	—	+
■ anti-A	—	+	+
Lizotipla cu bacteriofagul TB	—	+	—

■ *Structurii antigenice.* Brucelele posedă două complexe antigenice majore, A și M, prezente în cantități diferite la fiecare specie. Folosim seruri monospecifice anti-A și anti-M în reacții de aglutinare. Cultura de *B. melitensis* aglutinează numai cu serul anti-M, cea de *B. abortus* cu serul anti-A, iar cea de *B. suis* cu ambele seruri imune.

■ *Sensibilității la fagul Tb* (Tbilisi) a speciei *B. abortus*.

Etapa IV. Se citește și se interpretează rezultatele testelor de identificare a speciei de *Brucella*, după care se completează buletinul de analiză.

18.2.2. Diagnosticul imunologic

Diagnosticul imunologic este o metodă obișnuită.

Urmărim prezența și titrul anticorpilor anti-*Brucella* și, prin test intradermic, starea de sensibilizare la aceste bacterii.

Anticorpilor anti-*Brucella* pot fi depistați uzual din zilele 7—8 ale bolii. În stadiul acut al infecției sunt din clasa IgM, iar în stadiile tardive, subacut sau cronic, din IgG (rezistenți la acțiunea 2-mercaptoetanolului și la expuneri de 15—30 minute la 65°C). În stadiul subacut sau cronic al brucelezei apar anticorpi monovalenți blocați, care inhibă reacția de aglutinare.

Pentru diagnosticul serologic al brucelezei se utilizează reacții de aglutinare pe lamă sau în tuburi, reacția Coombs pentru depistarea anticorpilor blocați, reacțiile de fixare a complementului, opsonocitofagică sau de imunofluorescență indirectă.

Reacția de aglutinare rapidă pe lamă, Huddleson folosește antigen brucelic concentrat și colorat. Pe o placă de sticlă se depun, la intervale, picături cu cantități descrescând de ser suspect: 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 ml, alături de care se depun picături de antigen Huddleson în cantități egale de 0,03 ml (tabelul 18.2). Cu colțul unei lame de microscop se amestecă picăturile de reactivi începând de la diluția mai mare spre diluția mai mică a serului. Cu alt colț al lamei se amestecă picăturile martorilor, începând cu martorul antigen. Se încălzește lama la 37°C timp de 1—2 minute cu mișcări de rotație. Citirea se face după maximum 8 minute (interval în care placa este menținută în cameră umedă). Se urmărește apariția și mărirea grunților violeți-albaștri de aglutinare și se face clarificarea amestecului. Suspensiile martor trebuie să rămână omogene, colorate în violet. Rezultatul se exprimă după o scară convențională în procente de aglutinare: 100; 75, 50 și 25 (respectiv +4 la +1). O aglutinare de 50% corespunde unui titru de 1:100 în reacția Wright, titrul minim semnificativ.

Tabelul 18.2. Schema reacției de aglutinare rapidă pe lamă, Huddleson

Reactivi	Reacția, diluții de ser				Martorii	
	1	2	3	4	ser	antigen
Ser suspect	0,08	0,04	0,02	0,01	0,04	—
Antigen Huddleson	0,03	0,03	0,03	0,03	—	0,03
Soluție salină izotonă	—	—	—	—	0,03	0,03
Titrul corespunzător în reacția Wright	1/50	1/100	1/200	1/400		

Reacția Huddleson este indicată pentru triajul serurilor în focarele de bruceleză. Rezultatele pozitive trebuie verificate prin reacția Wright.

Reacția de aglutinare lentă în tuburi, Wright. În tuburi de aglutinare efectuăm, cu soluție salină izotonă, diluții duble ale serului suspect de la 1:12,5 până la 1:400 în volume de 0,5 ml. În fiecare tub pipetăm apoi câte 0,5 ml antigen Wright (suspensie de brucele omorâte standardizată la 20 miliarde germeni/ml) diluat 1:10 (tabelul 18.3). Toate tuburile

sunt incubate 20—24 ore la 37°C, apoi încă 1—2 ore la temperatura camerei. Citim reacția cu ochiul liber prin comparație cu tuburile martor și notăm intensitatea aglutinării de la +4 la 0 după cum urmează: +4 = supernatant clar cu depozit de aglutinat, care la agitare apare grunjos în lichidul transparent; 0 = suspensie omogenă similară cu martorul antigen; +2 = supernatant cu opacitatea martorului 2 antigen și depozit de aglutinat grunjos. Titrul minim semnificativ pentru diagnostic este 1:100 cu aglutinare +2. Titrurile de 1:50 sunt dubioase.

Tabulă 18.3. Schema reacției de aglutinare lentă în tuburi, reacția Wright, pentru diagnosticul brucelezei

Reactivi	Reacția propriu-zisă (numărul tuburilor și cantități, ml)						Martor ser	Martori antigen ¹	
	1	2	3	4	5	6		1	2
Soluție salină izotonă	0,92	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,92	0,5	0,75
Ser suspect	0,08	—	—	—	—	—	0,08	—	—
Diluția de ser	1:12,5	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	—	—	—
Antigen Wright (diluat 1:10)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5	0,25
Diluția finală a serului	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	—	—	—
¹ Martori de capacitate corespunzători respectiv 1: reacției negative (aglutinare 0) și 2: reacției pozitive 50% (++)									

În reacția Wright aglutinarea poate lipsi la primele diluții de ser sau complet, din cauza anticorpilor blocanți monovalenți, situație frecventă în stadiul cronic al infecției. Anticorpilor blocanți pot fi depistați prin reacția Coombs: în tuburile negative ale reacției Wright se adaugă la antigenul brucelic (spălat pentru îndepărtarea imunoglobulinelor fixate nespecific și resuspensionat) o cantitate determinată de ser antiimunoglobulină umană. Aglutinarea indică prezența anticorpilor blocanți. Un titru de 1:100 în reacția Coombs este diagnostic semnificativ.

Clasa anticorpilor anti-*Brucella*, IgM sau IgG, se determină prin reacția Wright sau reacția de hemaglutinare indirectă (pasivă), cu hematii cuplate cu antigen brucelic, efectuate în paralel cu probe ale serului suspect tratate și netratate cu 2-mercaptoetanol. Diferența mare dintre titruri indică predominanța anticorpilor IgM (infecție primară acută). Diferențe nesemnificative între titruri semnifică predominanța anticorpilor IgG (infecție cronică sau latentă subclinică).

Reacția de fixare a complementului (vezi 10.2.2.3). Titruri semnificative sunt cele $\geq 1:10$ din zilele 12—14 de boală. Reacția este mai ales utilă în formele cronice și latente de bruceleză. Se negativează o dată cu vindecarea microbiologică. În reacțiile postvaccinale pozitivarea este tranzitorie.

Reacția opsonofagocitară. Deși nu are valoare diagnostică, de obicei, evaluează gradul de rezistență a bolnavului (valoare prognostică). Serul bolnavilor de bruceleză opsonizează o suspensie de brucele și stimulează fagocitoza semnificativ mai puternic decât serul persoanelor normale.

Tehnica reacției: într-un tub, la amestecul de 0,25 ml suspensie standardizată de brucele inactivate în fază S cu 0,25 ml soluție 2% citrat de sodiu, se adaugă 0,5 ml sânge de la bolnav. În tubul martor, la amestecul aceluiași reactivi, se adaugă 0,5 ml sânge de la o persoană sănătoasă. Din conținutul tuburilor, incubate 20 minute la 37°C, se efectuează frotiuri subțiri colorați Giemsa. Se numără brucelele fagocitate de 25 polimorfonucleare examinate consecutiv, înregistrând intensitatea fagocitozei conform tabelului 4.4.

Tabelul 18.4. Calcularea indicelui opsonocitofagic (IOC)

Numărul germeilor fagocitați per PMN	Intensitatea fagocitozei	Numărul de PMN din grupa de intensitate	Calcularea IOC (coloanele 2x3)
0	0(0)	0	0 x 0 = 0
1—20	+(1)	6	1 x 6 = 6
21—40	++(2)	4	2 x 4 = 8
≥ 41	+++ (3)	15	3 x 15 = 45
<i>Total:</i>		25	59

La persoanele sănătoase IOC variază între 0 și 10. La bolnavi un indice între 11—24 este dubios, unul între 25—49 este pozitiv, iar unul între 50—75 este intens pozitiv și corespunde unei bune reactivități imune.

Diagnosticul serologic prin reacțiile moderne de *hamaglutinare indirectă*, *ELISA*, *colorație imunofluorescentă indirectă* este mai sensibil în formele cronice și latente ale infecției și elimină rezultatele fals pozitive prin reacții încrucișate cu fracțiuni antigenice comune între *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* sau *Vibrio cholerae*.

Intradermoreacția Burnet depistează sensibilizarea de tip întârziat la brucelelină (revedi tabelul 11.1). După 24—48 ore se măsoară diametrul zonei infiltrativ-eritematoase. Interpretare: diametrul de 10 mm indică o reacție slab pozitivă, de 30 mm o reacție pozitivă, de 60 mm o reacție intens pozitivă. Intradermoreacția la brucelelină se pozitivează după 14—30 zile de la debutul bolii sau după vaccinarea cu vaccin viu atenuat și persistă timp îndelungat.

În concluzie:

- Diagnosticul de bruceleză acută se confirmă prin reacțiile Huddleson și Wright pozitive cu anticorpi predominant din clasa IgM, RIF indirectă și i.d.r. Burnet slabă sau pozitivă.

- Diagnosticul de bruceleză cronică sau latentă se confirmă prin predominanța anticorpilor din clasa IgG; reacția Coombs și RFC pozitive la titruri semnificative, i.d.r. Burnet pozitivă sau intens pozitivă.

18.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul brucelezei

- Antigen Huddleson: suspensie de *Brucella* omorâtă și colorată cu 20 miliarde germeni/ml.

- Antigen Wright: suspensie de *Brucella* omorâtă cu 20 miliarde germeni/ml.

- Suspensie eritocitară sensibilizată cu antigen brucelezic.

- Seruri imune monospecifice A și M anti-*Brucella*.

- Bacteriofag anti-*Brucella Tb* (Tbilisi).

- Brucelelină.

- Vaccin anti-*Brucella* omorât (curativ) sau viu atenuat (profilactic).

- Antibiotice: tetraciclină + streptomycină, biseptol.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TULAREMIEI

Tularemia este o zooantroponoză cauzată de *Francisella tularensis*. Primar boală a rozătoarelor și altor animale, se transmite la om și afectează ganglionii limfatici cu generalizare septicemică, stare toxemică și leziuni granulomatoase diseminate visceral.

19.1. DATE GENERALE

19.1.1. O minidefiniție

Genul *Francisella* reunește cocobacilii gramnegativi, imobili, oxidazonegativi și slab catalazopozitivi. Strict aerobi, necesită pentru creștere cistină și cisteină. Atacă zaharurile oxidativ, lent.

19.1.2. Repere taxonomice

Genul *Francisella* este format din două specii: *F. tularensis*, agentul etiologic al tularemiei, și *F. philomiragia*, semnalată în S.U.A. drept cauză a unor infecții sistemice ale omului.

F. tularensis are patru biovaruri:

- *F. tularensis nearctica*, cel mai patogen pentru om, cu circulație în America de Nord.
- *F. tularensis holarctica*, mai puțin virulent pentru om, cu circulație în Europa, America de Nord și Asia.
- *F. tularensis centro-asiatică*, identificată de microbiologii ruși, are patogenitate intermediară între biovarurile nearctica și holarctica.
- *F. tularensis novicida*, izolată în S.U.A., provoacă îmbolnăviri asemănătoare tularemiei.

19.1.3. Habitat

Franciselele sunt găzduite de rozătoare variate de la o regiune geografică la alta. A fost izolată și de la alte specii ca vulpea, nevăstuica, pisica etc. Din aceste surse infecția se transmite la om prin vectori biologici (căpușe, tăuni, jânjari), prin contact direct sau

mediat de elemente contaminate ale mediului (apă, aer, alimente) în care franciselele supraviețuiesc săptămâni sau luni.

19.1.4. Factori de patogenitate

Francisella tularensis este un organism facultativ intracelular. Principalii factori de patogenitate sunt substanța capsulară de supra- și endotoxină.

19.1.5. Receptivitatea la tularemie

Receptivitatea omului la tularemie este generală. Dintre animale cele mai receptivă sunt rozătoarele, în special șoarecii.

19.1.6. Tularemia

Gravitatea și forma clinică a infecției variază cu poarta de intrare și virulența tulpinii infectante:

- *Forma ulceroganglionară* este cea mai frecventă. La poarta de intrare, abraziune minimă a tegumentului mâinii sau înțepătura unui artropod hematofag, apare o papulă, care se transformă în pustulă și, în scurt timp, se ulcerează. Apar trenee de limfangită și adenită regională, bubonul tularemic.

- *Forma ganglionară* evoluează cu adenită tributară porții de intrare, dar fără leziune vizibilă la acest nivel.

- *Forma oculoganglionară* are poartă de intrare conjunctivă și evoluează ca o conjunctivită severă unilaterală cu adenită preauriculară.

- *Forma anginoganglionară* este asemănătoare cu angina Vincent sau cu cea difterică, fiind însoțită de adenită cervicală.

Forme grave, septicemice sunt: cea tifoïdă sau abdominală, cu poartă de intrare digestivă, și cea pulmonară, cu poartă de intrare respiratorie.

19.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A TULAREMIEI

19.2.1. Diagnosticul microbiologic

19.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de forma clinică a bolii, se examinează: exsudat din ulcerul cutanat, aspirat din bubonul tularemic, exsudate conjunctival și faringian, spută, hemoculturi.

19.2.1.2. Microscopie directă

Microscopia directă a prelevatelor de la om colorate uzual rămâne negativă. Numai examenul frotiurilor colorate imunofluorescent depistează și identifică rapid *F. tularensis*.

19.2.1.3. Izolarea și identificarea

Izolarea și identificarea *F. tularensis* sunt rezervate laboratoarelor specializate (din cauza riscului infecției de laborator). Izolarea de la bolnav direct pe mediile de cultură artificiale rămâne cel mai frecvent negativă.

Mult mai sensibilă este izolarea prin injectarea prelevatelor patologice la șoarece sau cobai intraperitoneal (sânge, aspirate necontaminate, omogenat de organe), subcutan sau percutan (prelevatele contaminate). Animalele inoculate sunt urmărite 10—15 zile. Dacă animalele infectate nu mor în acest interval, se fac pasaje oarbe cu omogenat din splină și ficat.

La necropsia animalelor bolnave se constată noduli necrotici ganglionari, hepatici și splenici. La șoareci boala evoluează mai rapid și se constată macroscopic numai hipertrofia ganglionară, splenică și hepatică. La cobai moartea survine lent și se observă noduli necrotici albi-gălbui, mai ales în ficat.

Pe amprente de organe colorate Giemsa se observă cocobacili uniformi, capsulați, aglomerați în mari cantități în nodulii necrotici. Colorația imunofluorescentă permite identificarea directă, dar este mai puțin accesibilă.

Omogenatul de ficat și splină este însămănțat pe medii special îmbogățite: Francis (geloză nutritivă îmbogățită cu sânge, glucoză și cistină) sau Mac Coy (mediu cu gălbenuș de ou coagulat în pantă), pe care *F. tularensis* formează, după 48—72 ore de incubare aerobă la 37°C, colonii mici, transparente, lucioase.

Identificarea izolatelor se face biochimic, urmărind producerea de H₂S, fermentarea glucozei și maltozei. Fermentarea glicerolului și producerea de citrulinureidază diferențiază biovarurile. Decisivă în identificare este însă aglutinarea cu ser anti-*F. tularensis* și patogenitatea experimentală.

19.2.2. Diagnosticul indirect

După cca 5 zile de boală apare sensibilizarea la tularină; iar din zilele 6—7 de boală pot fi depistați anticorpii serici. Diagnosticul indirect al tularemiei este metoda de elecție pentru majoritatea laboratoarelor.

19.2.2.1. Diagnosticul serologic

Se efectuează reacția de aglutinare. La diluții duble ale serului suspect, efectuate în volume de 0,5 ml de la 1:10 la 1:1280, se adaugă 0,5 ml antigen tularemic (suspensie de germeni omorâți prin fenol sau alcool). După incubarea tuburilor 2 ore în baie de apă la 40°—50°C și menținerea apoi peste noapte la +4°C, se citește reacția urmărind clarificarea supernatantului cu apariția unui depozit, care se disociază prin agitare în granule fine de germeni aglutinați.

Semnificative diagnostic sunt titruri de cel puțin 1:80, care cresc de minimum patru ori în cursul bolii, putând depăși 1:1280. În convalescență titrurile scad progresiv și se mențin la valori de 1:40—1:60 chiar 15—20 ani. Uneori se observă fenomen de prozonă cu absența aglutinării la diluțiile mici de ser. La persoanele vaccinate titrul aglutinelor este mai mic decât la bolnavi.

Serul bolnavilor de tularemie poate reacționa încrucișat cu suspensii de *Brucella* sau, invers, serul bolnavilor de bruceloză poate reacționa cu antigenul tularemic. Pentru a clarifica asemenea situații recurgem la absorbția aglutinelor, urmărirea titrurilor în dinamică și i.d.r. cu tularină și brucelină.

Teste mai sensibile, dar mai puțin accesibile, pentru serodiagnosticul tularemiei, sunt: reacția de *hemaglutinare indirectă* și *ELISA*.

19.2.2.2. Testul intradermic cu tularină

Se injectează intradermic pe fața anterioară a unui antebraț 0,1 ml tularină (vezi tabelul 11.1), iar la antebrațul opus soluție salină glicerinată 3%. Se citește reacția după 48 ore. O papulă infiltrativ-eritematoasă cu diametrul de cel puțin 10 mm, în absența oricărei reacții la martor, semnifică un test pozitiv. La pacienții intens sensibilizați pot să apară vezicule în centrul leziunii sau reacție ganglionară. I.d.r. la tularină este pozitivă și la convalescenți sau vaccinați.

19.2.3. Biopreparate folosite pentru diagnosticul și profilaxia tularemiei

- Tularină (vezi tabelul 11.1).
- Suspensie omorâtă de *F. tularensis* cu 2 miliarde germeni/ml pentru reacții de aglutinare.
- Suspensie de hematii sensibilizate cu antigen *F. tularensis* sau imunoglobuline antitularemice.
- Vaccin viu atenuat anti-*F. tularensis*.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL YERSINIOZELOR

20.1. DATE GENERALE

20.1.1. O minidefiniție

Yersiniile sunt bacili scurți până la cocobacili, gramnegativi, care fixează colorantul bipolar. Mobili sau imobili. Cresc pe medii simple în prezența bilei. Oxidazonegativi și catalazopozitivi. Facultativ anaerobi, atacă zaharurile fermentativ fără producere de gaz sau numai cu cantități minime. Multe caractere fenotipice (e. g. mobilitatea) sunt dependente de temperatura de incubare, fiind mai caracteristic exprimate la 25—29°C decât la 37°C.

20.1.2. Repere taxonomice

Genul *Yersinia* aparține familiei *Enterobacteriaceae* și reunește speciile:

- *Yersinia pestis*, cu 3 biovaruri, *antiqua*, *medievalis* și *orientalis*, agentul etiologic al pestei, boală numită și ciumă;
- *Yersinia pseudotuberculosis*, care provoacă la animale pseudotuberculoza, iar la om adenite mezenterice și infecții cu alte localizări;
- grupul *Yersinia enterocolitica*, în care, pe lângă specia tip *Y. enterocolitica*, cu 5 biovaruri, sunt reunite mai multe specii asemănătoare, care la om determină mai frecvent enterocolite.

20.1.3. Habitat

Yersinia pestis parazitează peste 200 specii de rozătoare în focare naturale din Centrul Asiei și Africii (biovarul *antiqua*), Orientul Apropiat și Mijlociu (biovarul *medievalis*) sau S.U.A., America de Sud, Africa și Asia (biovarul *orientalis*). Între rozătoare infecția se transmite prin înțepătura puricilor sau solul contaminat al galeriilor în care *Y. pestis* se poate multiplica și la -2°C. Omul și alte specii animale decât rozătoarele devin gazde accidentale obișnuit infectate prin înțepătura puricilor.

Yersinia pseudotuberculosis și grupul *Y. enterocolitica* parazitează o gamă largă de mamifere și păsări și ocazional omul. Cu fecalele contaminează variate elemente de mediu, prin care se transmit de la o gazdă la alta.

20.1.4. Factori de patogenitate

Yersiniile sunt bacterii facultativ intracelulare toxigene. Virulența lor este codificată de gene cromozomiale și plasmidice, fiind evident modulată prin condițiile mediului ambiant, în special temperatură, pH, concentrație de calciu și fier. De aceea virulența tulpinilor de *Yersinia* este foarte variabilă.

Cel mai bogat echipament de patogenitate îl are *Y. pestis*:

- fracțiunile antigenice de înveliș F1, V și W și proteinele de membrană îi conferă capacitatea de a supraviețui și de a se multiplica în macrofage;
- fibrinolizina îi asigură invazivitatea;
- exotoxinele A și B;
- endotoxina.

Tulpinile virulente produc *pesticine* și sunt pigmentogene pe mediile cu hemină sau cu roșu Congo.

Yersinia pseudotuberculosis și *Y. enterocolitica* au factori de patogenitate comuni cu *Y. pestis* cum sunt proteinele de membrană și antigenii V și W, care le asigură capacitatea de a penetra, supraviețui și multiplica în fagocite. Unele tulpini de *Y. pseudotuberculosis* din serovarul O III produc o toxină letală pentru iepuri și cobai. *Y. enterocolitica* produce o enterotoxină termostabilă. Tulpini ale speciilor din grupul *Y. enterocolitica* au capacități enteroinvazive, dar nu produc toxine.

20.1.5. Receptivitatea la infecția cu yersinii

Receptivitatea la pestă este generală.

Linfadenitele mezenterice determinate de *Y. pseudotuberculosis* sau grupul *Y. enterocolitica* au potențial septicemic la gazda imunocompromisă.

20.1.6. Yersiniozele

20.1.6.1. Pesta

Episodic, rozătoarele din focarele naturale de pestă se interpătrund cu rozătoarele peridomestice (șobolanii *Rattus rattus*, *R. norvegicus*; șoarecii de casă), cărora le transmit infecția realizând o epizootie de pestă «domestică». Omul contractează pesta fie când pătrunde într-un focar natural (exploratori, vânători etc.), fie în cursul unei epizootii de pestă domestică. Transmiterea infecției la om se face prin înțepătura vectorilor — purici și alți ectoparaziți ai rozătoarelor, apoi interuman prin *Pullex irritans*, puricele omului sau aerogen.

Pesta bubonică. Pe tegument, la locul înțepăturii vectorului, după o incubajie de 1—6 zile apare o pustulă sau ulcerăție însoțită de adenită cu periadenită regională hemoragică: bubonul pestos. Infecția evoluează septicemic cu localizări viscerale și în tegument, unde se produc inflamații hemoragice cu focare de necroză. Când bubonul supurează și se fistulizează, infecția se limitează la etapa ganglionară.

Pesta pulmonară apare după 3—4 zile de la inhalarea bacteriei și evoluează ca o bronhopneumonie hemoragică foarte contagioasă și letală în mai puțin de 72 ore.

20.1.6.2. Alte yersinioze

Sindroamele clinice cauzate de alte yersinii variază cu vârsta, sexul, reactivitatea și fondul genetic al pacienților. Mai frecvent infecția are poartă de intrare digestivă, doza infectantă fiind de cca 10^9 yersinii.

Y. enterocolitica produce mai frecvent enterocolite, ileite terminale, dar afectează și ganglionii mezenterici. Poate determina angine eritematoase. La pacienți cu haplotipul HLA-B27 determină, prin mecanism autoimun, poliartrite, eritem nodos și sindrom Reyer.

Y. pseudotuberculosis produce mai frecvent adenite mezenterice. Rar a fost implicată în infecții urinare.

La pacienții imunocompromiși aceste yersinioze pot depăși etapa ganglionară limfatică și evoluează septicemic.

20.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A PESTEI

20.2.1. Diagnosticul microbiologic

Diagnosticul microbiologic este rezervat laboratoarelor specializate.

20.2.1.1. Prelevate examinate

De la bolnavi, în funcție de forma clinică a bolii, se recoltează exsudat din afectul cutanat, aspirat din bubon, puroi, spută, hemoculturi, probe tisulare necrotice.

În focarul de infecție se mai prelevă: rozătoare moarte sau sacrificate, ectoparaziții lor, probe din solul galeriilor etc.

Toate prelevatele se transportă în condiții de maximă securitate, pentru a preveni contaminarea personalului și colectivității.

20.2.1.2. Microscopie directă

Microscopia directă pe frotiuri din exsudat, aspirat ganglionar, puroi, sânge, spută colorate Giemsa, cu albastru de metilen sau albastru toluidină depistează *Y. pestis* sub formă de cocobacili colorați bipolar, dispuși izolat sau în perechi printre celulele inflamatorii. Colorația imunofluorescentă directă permite identificarea rapidă a *Y. pestis*.

20.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa 1. Se însămânțează prelevate necontaminate (aspirat ganglionar, probe biopice) pe geloză-sânge hemolizat și hiposulfat de sodiu (1:4000) ca stimulatori de creștere.

Prelevatele contaminate (spută, probe de la cadavre, broiat de purici, probe de sol) se epuizează pe medii selective prin adaos de violet de gențiană (1:100000—1:200000). Pentru succesul izolării este indicată neutralizarea fagului antipestos prin adăugarea la mediile de izolare a serului antifag.

Hemoculturile sunt indicate în fiecare formă clinică a bolii cu însămânțarea sângelui în bulion glucozat.

Se incubează culturile minimum 30 ore la 37°C sau mai bine la 28°C. O bacterie care cultivă înainte de 30 ore cel mai probabil nu este *Y. pestis*.

Etapa II. Se urmărește pe mediile solide apariția de colonii mici (0,1—1 mm diametru) cu centrul opac, periferia transparentă și marginile ondulate. În bulion *Y. pestis* determină turbiditate minimă, creșterea fiind sub aspect de peliculă superficială cu extindere de filamente în profunzimea mediului și depuneri la fundul recipientului.

Etapa III. Diagnosticul pestei fiind o urgență, testele de identificare nu se mai succed în ordinea clasică, ci cu unele inversiuni. Culturile sugestive sunt verificate microscopic și imediat se procedează la aglutinarea cu ser specific antipestos și testarea sensibilității la fagul antipestos.

Examenul ulterior al caracterelor de cultură (creșterea progresivă a coloniilor, formarea în bulion a unui vâl cu prelungiri sub formă de stalactite în profunzimea mediului, care rămâne relativ clar), biochimice (vezi tabelul 16.1) și patogenitatea pentru șoarece, sobolan sau cobai diferențiază izolatele de alte yersinii și le confirmă ca *Y. pestis*.

Tabelul 20.1. Caractere diferențiale ale yersiniilor

Caractere	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Grupul ¹ <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
Mobilitate (25°C)	—	+	+	d
Lizindecarboxilază	—	—	—	+
Ornitindecarboxilază	—	—	+	+
Urează	—	+	+	—
Gelatinază	—	—	—	+
Citrat (Simmons, 25°C)	—	— ²	D	+
Voges Proskauer (25°C)	—	—	+	d
Indoi	—	—	D	—
Gaz din glucoză	—	—	v	v
Acid din:				
■ glucoză	+	+	+	+
■ lactoză	—	—	D	—
■ ramnoză	—	+	D	—
■ zaharoză	—	—	+	—
■ sorboză	—	—	+	—
■ sorbitol	—	—	+	—
<p>Simboluri: ++ — 90% sau mai mult din tulpini pozitive; +- — 90% sau mai mult din tulpini negative; d — 11—89% din tulpini pozitive; v — caracter instabil la diferite tulpini (diferit de «d»); D — reacții diferite cu specia.</p> <p>¹ Grupul <i>Yersinia enterocolitica</i> cuprinde: <i>Y. enterocolitica</i>, <i>Y. aldovae</i>, <i>Y. frederiksenii</i>, <i>Y. intermedia</i>, <i>Y. kristensenii</i>.</p> <p>² Tulpinile din serovarul IV sunt citratpozitive.</p>				

Etapa IV. Se analizează, se interpretează și se comunică etapizat rezultatele testelor de identificare: e. g. «Am izolat un cocobacil gramnegativ, cel mai probabil *Y. pestis* conform testelor preliminare de identificare. Urmează confirmarea». «Confirmăm izolarea *Y. pestis*».

20.2.2. Diagnosticul serologic

Are numai o valoare retrospectivă, după cca 2 săptămâni de la debutul bolii. Se recurge la reacția de aglutinare, RFC sau testul de seroprotecție a șoarecelui, sau, mai bine, la *hemaglutinare indirectă* cu eritrocite sensibilizate cu antigenul F1.

20.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul și profilaxia pestei

- Ser antipestos fluorescent.
- Ser antipestos (F1) aglutinant.
- Bacteriofag antipestos.
- Suspensii omorâte de *Y. pestis*.
- Eritrocite sensibilizate cu fracțiunea antigenică F1 pentru serodiagnostic.
- Imunoglobulină antipestoasă.
- Vaccin viu atenuat antipestos.

20.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN ALTE YERSINIOZE

Se face microbiologic prin izolarea și identificarea *Y. pseudotuberculosis* sau a speciilor din grupul *Y. enterocolitica* (din materii fecale, biopsii ganglionare, apendice, probe de alimente etc.) sau serologic (depistarea anticorpilor în serul bolnavilor).

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ANTRAXULUI ȘI INFECȚIILOR CU BACILI ANTRACOIZI

21.1. DATE GENERALE

21.1.1. O minidefiniție

Genul *Bacillus* reunește bacili tipici grampozitivi în culturile tinere, majoritatea speciilor sunt mobile cu flageli peritrichi; neacidorezistenți. Produc spori foarte rezistenți, iar sporularea nu este represată prin expunere la aer, uneori fiind chiar stimulată. Catalazopozitivi. Aerobi sau facultativ anaerobi. Au activități biochimice foarte diverse.

21.1.2. Repere taxonomice

Genul *Bacillus* face parte din familia *Bacillaceae*, care mai cuprinde și bacili grampozitivi sporulați anaerobi reuniți în genul *Clostridium* (vezi capitolele 22—24).

Dintre numeroasele specii de *Bacillus*, interes pentru microbiologia medicală prezintă *Bacillus anthracis*, specie zoonantropofilă, agentul etiologic al antraxului, și speciile asemănătoare morfologic, pe care le numim generic bacili antracoizi. Toți bacili antracoizi pot contamina ocazional prelevatele patologice, iar în condiții particulare unii determină îmbolnăviri. De aici interesul pentru identificarea corectă a acestor bacili și precizarea semnificației lor în prelevatele patologice.

21.1.3. Habitat

Cele mai multe specii sunt larg răspândite în natură, dar din cauza rezistenței sporilor, izolarea lor într-o circumstanță sau alta nu ține în mod necesar de habitatul natural.

Bacillus anthracis este un patogen al unor animale și al omului. *B. thuringiensis* și alte specii sunt patogene ale insectelor. Multe specii le găsim în apele de suprafață, în sol și excrementele omului sau ale variatelor animale; sunt implicate în degradarea alimentelor contaminate, iar unele determină toxiiinfecții alimentare sau sunt accidental patogene. Câteva specii sunt termofile facultative (*B. subtilis* ș. a.) sau obligate (*B. stearotermophilus*).

21.1.4. Factori de patogenitate

Cel mai frecvent patogenitatea acestor bacterii este codificată plasmidic. *B. anthracis* produce o capsulă (factor antifagocitar), codificată de plasmidul pXO1, și o toxină complexă, codificată de plasmidul pXO2. În toxina *B. anthracis* sunt identificate trei com-

ponente: factorul edematogen (FE), factorul letal (FL) și antigenul protector (AP). Fixarea *B. anthracis* pe celulele eucariote se face prin AP, care recunoaște receptorii membranari specifici și permite astfel pătrunderea în celulă a componentelor toxice propriu-zise FE și FL. Anticorpii anti-AP previn fixarea bacteriei pe celulă și împiedică astfel efectul toxic al complexului.

B. cereus produce o toxină emetizantă, o enterotoxină diareigenă, două hemolizine și fosfolipaze. Penicilinaza produsă de *B. cereus* interferează tratamentul cu acest antibiotic al infecțiilor mixte, în care se asociază, chiar în calitate de simplu organism de colonizare.

Factorii de patogenitate ai altor bacili antracoizi implicați ocazional în infecții umane nu au fost încă identificați cu certitudine.

21.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu *Bacillus*

Receptivitatea la antrax este generală, dar infecția apare mai frecvent ca boală profesională (vezi mai jos).

Toxiinfecții alimentare după multiplicarea *B. cereus*, *B. licheniformis* și *B. subtilis* apar prin consumul de alimente în care aceste specii se multiplică în cantități de peste 10^5 UFC/g. Alte infecții cu bacili antracoizi au fost semnalate la pacienți imunocompromiși sau debilitați (alcoolici, diabetici). Uneori, probabil, își manifestă potențialul patogen în asociații sinergice cu alte bacterii. *B. cereus* poate avea și rol patogen primar, când infectează plăgi, mai ales plăgi oculare.

21.1.6. Infecțiile determinate de speciile genului *Bacillus*

Antraxul, în raport cu poarta de intrare, are trei forme clinice: cutanată, pulmonară și digestivă.

■ *Antraxul cutanat* este forma cea mai frecventă a bolii la om. La poarta de intrare, chiar și la o simplă abraziune, apare inițial o papulă, care evoluează rapid în veziculă și pustulă pe un fond de edem pronunțat, dar nedureros. Leziunea se ulcerează și se acoperă cu o crustă neagră, asemănătoare cărbunelui antracit (de unde și numele bolii). Progresiv edemul se accentuează, crusta se extinde și în jurul ei apare o coroană de vezicule. Limfadenita regională însoțește leziunea locală. Mai frecvent afectate de antrax sunt zonele cele mai expuse contaminării (mâini, față, ceafă), în special la îngrijitorii de animale, tăbăcari etc.

■ *Antraxul pulmonar* apare după inhalarea sporilor de *B. anthracis* de către lucrătorii din industria lânii, blănurilor, făinii de oase sau după folosirea lor ca armă bacteriologică. Evoluează ca o pneumonie complicată precoce cu mediastinită extrem de gravă.

■ *Antraxul digestiv*, formă uzuală la animale, la om apare rar după consumul cărnii de la animalele bolnave de antrax insuficient prelucrată termic. Evoluează ca o enterocolită hemoragică, toxică.

Toate formele de antrax pot evolua *septicemic*, iar *meningoencefalita cărbunoasă* este o complicație posibilă și mortală.

În afară de toxiinfecții alimentare, bacilii antracoizi determină infecții locale (e. g. ale plăgilor, oftalmite, pneumonii, pleurezii) sau sistemice (e. g. bacteriemii, septicemii, endocardite, meningite, osteomielite). Mai frecvent este implicat *B. cereus*, urmat de *B. licheniformis*, *B. subtilis* și excepțional de alte specii.

21.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR DETERMINATE DE SPECII DIN GENUL *Bacillus*

21.2.1. Diagnosticul microbiologic

Diagnosticul antraxului este rezervat laboratoarelor specializate, care pot asigura condițiile de securitate microbiologică necesare: e. g. laboratorul Centrului Republican de Igienă și Epidemiologie.

21.2.1.1. Prelevate patologice

Suspiciunea de antrax impune precauții deosebite la prelevarea și transportul probelor, pentru a preveni contaminarea personalului și colectivității. În raport cu forma clinică, se prelevă: exsudate din carbunculul cutanat, aspirat din edemul local și ganglionii regionali, spută, materii fecale, hemoculturi, lichid cefalorahidian, probe necroptice. Când se impune, necropsia va fi executată cu precauție maximă, deoarece după deschiderea cadavrului, în contact cu aerul, *B. anthracis* sporulează.

În infecțiile cu bacili antracoizi prelevatele sunt foarte variate: de la alimente, vărsătură și materii fecale în toxiinfecțiile alimentare, la exsudate din plăgi, spută, exsudat pleural, sânge etc., în funcție de localizarea infecției.

21.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă orientează rapid diagnosticul. Se efectuează pe frotiuri sau amprente de organe colorate cu albastru de metilen policrom și Gram. În caz de antrax se observă printre celulele inflamatorii sau tisulare bacili mari de $4-10 \mu\text{m}/1-1,5 \mu\text{m}$, cu capetele retezate, dispuși izolat, în perechi sau streptobacili (cu aspectul tulpinii de bambus), grampozitivi, capsulați și nesporulați. Prin colorația cu albastru de metilen policrom capsula se observă mai bine, colorată metacromatic în roz, ca un înveliș continuu în jurul bacililor înlănțuiți. La pacienții cu antrax cutanat microscopia prin colorații uzuale este pozitivă numai în stadiul precoce al bolii.

Bacili antracoizi apar în prelevatele patologice cu caractere microscopice asemănătoare *B. anthracis*. De aceea decisivă pentru identificarea microscopică rapidă a *B. anthracis* în prelevatele patologice este colorația imunofluorescentă.

21.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Prelevatele patologice se epuizează pe câte o placă cu geloză nutritivă și cu geloză-sânge, cu incubare aerobă peste noapte la 37°C . Hemoculturile se însămânțează în bulion glucozat. Prelevatele hipercontaminate (materii fecale, alimente, probe necroptice de la cadavre în putrefacție) se epuizează pe un mediu selectiv corespunzător speciilor urmărite. E. g. pentru *B. anthracis* geloză cu polimixină B, lizozim, EDTA și acetat de taliiu; pentru *B. cereus* medii cu polimixină B și clorură de litiu etc.

Etapa II. Se urmăresc coloniile suspecte.

Coloniile de *B. anthracis* sunt mari, rugoase, cu aspect de sticlă pisată, nehemolitice, cu circumferință neregulată, care, examinată la stereomicroscop (10X), apare înconjurată cu prelungiri laterale ondulate («în coamă de leu» sau «în cap de meduză»), datorate dispunerii streptobacililor în lanțuri paralele. Particulară coloniilor de *B. anthracis* este «tenacitatea»: marginea coloniei ridicată ușor cu acul de inoculare rămâne erectă ca albușul de ou bine bătut spumă.

În general, bacilii antracoizi formează colonii hemolitice.

Coloniile de *B. cereus* sunt asemănătoare cu cele de *B. anthracis*, dar lipsite de «tenacitate» și fără creștere de lanțuri laterale.

Coloniile de *B. subtilis* sunt mari, tind să invadeze suprafața mediului insuficient uscată. Rotunde sau neregulate, opace, devin progresiv zbârcite și se colorează în crem sau brun.

B. licheniformis formează colonii opace, rugoase cu periferia «în cap de meduză», puternic aderente de mediu. Progresiv se acoperă cu substanță mucoasă și devin brune.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

a) *Microscopice.* *B. anthracis*, *B. cereus* și *B. licheniformis* se dispun în lanțuri și au spor oval, central, care nu deformează bacilul. *B. subtilis* apare rar în lanțuri.

B. anthracis este imobil, bacilii antracoizi sunt mobili.

b) *Aspectul culturii în bulion.* *B. anthracis* formează un depozit floconos cu supernatant clar, *B. cereus* tulbură uniform mediul cu un depozit ușor de dispersat, *B. subtilis* crește sub formă de peliculă încrețită cu mediul subiacent clar. *B. licheniformis* formează un depozit mucos cu supernatant clar.

c) *Aspectul culturii în coloană de gelatină nutritivă* însămânțată prin înțepare. *B. anthracis* lichefiază gelatina cu aspectul de brad răsturnat cu vârful în jos. Bacilii antracoizi pot lichefia gelatina, dar cu aspecte de creștere diferite: infundibuliformă (*B. cereus*), de sfeclă (*B. subtilis*).

d) *Creșterea pe mediul cu etilendiaminotetraacetat (EDTA) - polimixinălizozim.* *B. anthracis* crește, bacilii antracoizi nu cresc.

e) *Sensibilitatea la fagol și anti-B. anthracis.*

f) *Testul colierului de perle.* Se cultivă tulpina de testat la 37°C pe geloză nutritivă cu 0,5—1 UI penicilină. Se examinează cu mărire de 100X frotiuri din cultura de 6—8 ore. Numai *B. anthracis* formează în aceste condiții lanțuri de forme globulare.

g) *Patogenitatea pentru șoareci.* După injectarea culturii la șoareci, *B. anthracis* determină infecție septicemică mortală în 1—3 zile și poate fi observat cu morfologia caracteristică pe frotiuri din sânge și amprente de splină. Bacilii antracoizi sunt avirulenți pentru șoareci.

Apariția tulpinilor de *B. anthracis* rezistente la penicilină obligă la efectuarea *antibiogramei*, test necesar și pentru bacilii antracoizi implicați în infecții locale sau sistemice.

Izolarea prin infectarea șoarecilor sau cobailor. Este o metodă sensibilă indicată pentru prelevatele hipercontaminate (spută, materii fecale, sol etc.), care sunt injectate subcutanat. După 48 ore (până la 15 zile de supraveghere) animalele infectate cu *B. anthracis* mor prin septicemie; vezi mai sus patogenitatea experimentală.

Implicarea bacililor antracoizi în toxiinfecțiile alimentare poate fi demonstrată când îi izolăm în cantități mai mari de 10^5 UFC/g aliment sau când aceeași specie și același serovar sunt izolate din aliment și din fecalele bolnavilor, dar sunt absente în fecalele martorilor (persoane din aceeași colectivitate care nu s-au îmbolnăvit).

Semnificația bacililor antracoizi izolați din prelevatele necontaminate (e. g. sânge, lichid cefalorahidian etc.) este clară. Prezența lor în prelevate contaminate (e. g. exsudate din plăgi) trebuie interpretată prudent.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează și se redactează buletinul de analiză: e. g. «Din ... am izolat *B. anthracis*» sau «Am izolat *Bacillus ...*» (cu precizarea speciei antracoide semnificativă clinic).

21.2.2. Diagnosticul prin metode imunologice

Intradermoreacția cu antraxină (extract complex proteinopolizaharidonucleic obținut de E. Șleahov din tulpina vaccinată de *B. anthracis*) depistează o sensibilizare de tip întârziat. În 1/3 mijlocie a antebrațului se injectează intradermic 0,1 ml antraxină și se citește efectul după 24—48 ore. O papulă infiltrativă cu diametrul peste 8 mm, în absența reacției la antebrațul martor, semnifică reacție pozitivă, prezentă la foști bolnavi și la vaccinați.

Diagnosticul retrospectiv al antraxului la cadavre, în pieile animalelor etc. poate fi stabilit prin *reacția termoprecipitelor* descrisă de Ascoli. Se extrage antigenul termostabil al *B. anthracis* prin fierberea timp de 10—45 minute a probei suspecte omogenizate în soluție salină izotonă. În tuburi de precipitare se pipetează, fără a amesteca reactivii, filtratul absolut transparent al extractului antigenic și ser anticărbunos. Apariția unui inel opac de precipitare la limita dintre reactivi indică o reacție pozitivă: prezența antigenului cărbunos în proba examinată. Un martor pozitiv (antigen cărbunos + ser anticărbunos) și unul negativ (soluție salină izotonă + ser anticărbunos) trebuie să valideze specificitatea reacției.

21.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul, profilaxia și tratamentul specific al antraxului

- Bacteriofagul γ anti-*B. anthracis*.
- Ser imun precipitant pentru reacția Ascoli.
- Antraxină (extractul antigenic din tulpina vaccinată de *B. anthracis*), pentru depistarea sensibilizării specifice prin i.d.r.
- Vaccin viu atenuat: suspensie liofilizată de spori ai tulpinii atenuate de *B. anthracis*.
- Imunoglobulină umană hiperimună anti-*B. anthracis*.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CLOSTRIDIENE

22.1. DATE GENERALE

22.1.1. O minidefiniție

Clostridiile sunt bacili grampozitivi, cel puțin în culturile tinere. Majoritatea speciilor sunt mobile cu flageli peritrichi. Produc endospori, ovali sferici, care uzual deformează celula. Catalazonegativi. Anaerobi. Unele specii atacă zaharurile fermentativ, altele sunt azaharolitice.

22.1.2. Repere taxonomice

Genul *Clostridium* aparține, împreună cu genul *Bacillus*, familiei *Bacillaceae*. Dintre numeroasele clostridii numai câteva specii sunt patogene pentru om.

Sub raport medical clostridiile sunt divizate în:

- Clostridii histotoxice și invazive: *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum* etc.
- Clostridii toxigene noninvazive: *C. tetani* și *C. botulinum*.
- Clostridii saprofite, nepatogene, unele dintre ele implicate în degradarea alimentelor.

22.1.3. Habitat

Principalul habitat al clostridiilor este solul. Unele specii sunt găzduite și în intestinul omului sau animalelor. *C. perfringens* este constituent constant al microbiocenozelor colonului și vaginului. Din cele 5 serotipuri de *C. perfringens*, serotipul A este găzduit de om; serotipurile B—E sunt găzduite de animale, dar serotipul C are și tulpini umane (fostul serotip F, nerecunoscut în prezent). *C. difficile* este frecvent în colonul sugarilor hrăniți la sân, dar la adulți apare sporadic; *C. tetani* și *C. sporogenes* apar frecvent în fecalele animalelor, iar *C. histolyticum* ocazional. Rezistența sporilor le asigură supraviețuirea și vehicularea prin variate elemente de mediu: vegetale, praf, apă etc. Ca agenți de putrefacție, clostridiile joacă un rol important în ciclul azotului și carbonului în natură.

22.1.4. Factori de patogenitate

Factorii dominanți de patogenitate ai clostridiilor sunt *exotoxinele puternice cu acțiune specifică* și, suplimentar acestora, *enzimele proteolitice*, care asigură invazivitatea unor specii.

C. perfringens produce 14 factori de virulență, cu efecte toxice, marcați cu literele alfabetului grec de la α (alfa) până la ν (nii), hemolizinele non- $\alpha\delta\theta$ și enterotoxină. Dintre aceștia reținem:

- *Toxina α* , produsă de toate cele 5 serotipuri de *C. perfringens* (A, B, C, D, E), este cea mai importantă și acționează ca lecitinază Ca^{2+} dependentă cu efect hemolitic, necrotic și letal.

- *Toxina β* , produsă de serotipurile B și C, este un polipeptid foarte sensibil la tripsină. Cauzează enterite la oi, capre, miei, mânji, porci și, accidental, enterite necrotice la om.

- *Enterotoxina*, produsă de unele tulpini ale serotipurilor A și D, când acestea sporulează în colon, este o proteină din învelișurile sporale, care cauzează diaree prin pierdere hidroelectrolitică intestinală.

C. novyi produce factori toxici foarte activi care determină un masiv edem muscular gelatinos, necroză, hemoliză și efect letal.

Filtratul culturii de *C. septicum* este necrotic, hemolitic și letal. La locul injectării intramusculare țesutul devine intens roșu și apare edem hemoragic.

C. histolyticum este mai slab toxigen, în schimb produce proteaze și collagenaze foarte active, care pot determina chiar autoamputarea membrului atacat.

C. tetani produce două toxine: una hemolitică (tetanolizina) și una neurotrofă (tetanospasmina). Tetanospasmina este o proteină, antigenic unică, termolabilă, care nu se absoarbe din intestin și este distrusă de sucurile digestive. Se fixează pe ganglioziile din centrul motor al sistemului nervos central și sinapsele neuromusculare. Astfel fixată, suprimă inhibiția sinaptică, cu acumulare de acetilcolină și determină crize de contractură spastică generalizată.

Toxina botulinică este cea mai puternică otrăvă. După specificitatea antigenică a toxinei se cunosc 7 tipuri antigenice de *C. botulinum*, numite de la A la G. Este rezistentă la sucurile digestive și se absoarbe din intestin în formă activă. Termorezistența este relativă și variabilă cu tipul: după 2 minute de încălzire toxina tip A este distrusă la 60°C, tipurile B și E la 70°C, iar tipurile C și D la 90°C. Toxina tip F este termolabilă. Toxina botulinică blochează transmiterea influxului nervos prin inhibarea secreției de acetilcolină la nivelul sinapselor și joncțiunilor mioneurale, rezultând paralizii flasce.

22.1.5. Receptivitatea la infecțiile clostridiene

Bolile clostridiene apar numai în anumite circumstanțe:

- *Infecții de inoculare*. Presupun plăgi contaminate în care sporii clostridieni găsesc condiții favorabile germinării, multiplicării și elaborării toxinelor: plăgi profunde cu necroze tisulare, plăgi în condiții de tulburări circulatorii (e. g. endarterite trombozante), infecții mixte cu bacterii aerobe sau facultativ anaerobe. Așa sunt: gangrena gazoasă, tetanosul, botulismul plăgilor.

- *Boli cu poartă de intrare digestivă*: toxiinfecții alimentare prin tulpini enterotoxigene de *C. perfringens* ingerate în doze de cel puțin 10^8 organisme vii; intoxicații

alimentare după ingestia de toxină botulinică preformată în alimente; colonizarea intestinului cu tulpini de *C. perfringens* producătoare de toxină determină la indivizi cu hiposecreție de tripsină (animale foarte tinere, persoane denutrite) enterită necrozantă, iar colonizarea intestinului sugarilor (până la vârsta de 6 luni) cu *C. botulinum* determină botulismul infantil.

■ *Boli ecologice* ca enterocolita pseudomembranoasă postantibiotică determinată de *C. difficile*.

22.1.6. Bolile clostridiale

22.1.6.1. Gangrena gazoasă

Gangrena gazoasă este o toxiinfecție gravă care complică plăgi cu condiții de anaerobioză (traumatisme care interesează planul musculoaponevrotic cu devitalizări tisulare, plăgi la pacienți cu endarterită obliterantă, injectare septică de adrenalina etc.) contaminate cu floră microbială mixtă și spori de clostridii invazive vehiculați prin sol, praf, fecale, corpuri străine. Trei specii de clostridii invazive sunt agenți etiologici ai gangrenei gazoase: *C. perfringens*, specia cea mai frecvent implicată, *C. novyi* și *C. septicum*. Alte clostridii (e. g. *C. histolyticum*, *C. sporogenes* ș. a.) contaminează și infectează ocazional plăgi, dar în lipsa uneia din cele trei specii majore nu produc gangrenă gazoasă.

Clinic infecția se manifestă ca un flegmon gazos, crepitant, cu mionecroză, fasciită, invazie rapidă, scurgeri fetide din plagă, febră și intoxicație generală. În lipsa tratamentului precoce, evoluția spre șoc și moarte este rapidă.

22.1.6.2. Tetanosul

Este o toxiinfecție gravă care complică evoluția unei plăgi contaminate cu spori de *C. tetani*. Tetanolizina elaborată la poarta de intrare difuzează spre sistemul nervos pe calea axonilor și sangvină, determinând manifestările clinice ale bolii, contracții tonicoclonice și spasme paroxistice generalizate repetate. Moartea survine la cca 50% din pacienți.

22.1.6.3. Botulismul

Uzual este determinat de alimente conservate casnic, în care spori de *C. botulinum* (cu termorezistență remarcabilă) găsesc condiții de anaerobioză favorabile germinării și elaborării toxinei: carne și derivate (cârnați, jambon, șuncă), pește sărat și afumat, conserve vegetale cu pH alcalin (mazăre, sparanghel, spanac). Boala debutează după câteva ore până la 1—3 zile de la consumul alimentului contaminat cu toxină. Simptoamele tipice ale botulismului apar pe fond afebril și traduc afectarea predominant a nervilor cranieni: diplopie, ptoză palpebrală, disfagie, disartrie, amimic, astenie, senzație de sete, grețuri, vărsături, constipație, insuficiență și paralizie respiratorie, stop cardiac. Paralizii ale membrilor sunt posibile. Mortalitatea este ridicată. Cauză mai frecventă a intoxicației umane sunt serotipurile A, B, E de *C. botulinum*; rar serotipul F.

Apariția de paralizii în sfera nervilor cranieni la un pacient cu plagă orientează diagnosticul către botulismul plăgilor. Botulismul infantil este o cauză de moarte subită a sugarilor până la 6 luni.

22.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A GANGRENEI GAZOASE

Diagnosticul etiologic al gangrenei gazoase este o urgență în care singurele utile sunt metodele directe.

22.2.1. Diagnosticul microbiologic

22.2.1.1. Prelevate patologice

Se recoltează: serozitate din profunzimea plăgii, probe biotice din leziune, sânge; probe necrotice din leziune și organe.

În toxiinfecții alimentare se prelevă probe de fecale și din alimentele suspecte.

22.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă furnizează informații valoroase pentru tratamentul de urgență al gangrenei gazoase: chirurgical (stabilirea nivelului exciziilor tisulare), antimicrobian și antitoxic specific.

Examenul histopatologic intraoperator (extemporaneu) al probelor biotice delimitează țesutul afectat de cel sănătos prin depistarea leziunilor de celulită, fasciită și mionecroză.

Pe secțiunile histopatologice, pe amprente tisulare sau pe frotiurile serozității din plagă, *C. perfringens* apare ca bacili grampozitivi, uneori capsulați, sporulați sau nesporulați. De regulă, se observă și alte clostridii sporulate, dar necapsulate, și diverse bacterii de asociație. Uzual în serozitatea din plagă reacția inflamatorie este moderată sau minimă.

22.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează câte o ansă din probă pe o placă cu geloză-sânge glucozată și pe una cu geloză-gălbenuș de ou lactozată. Dacă frotiul direct a atestat prezența bacteriilor sporulate și numeroase alte bacterii nesporulate, se procedează la îmbogățirea clostridiilor după cum urmează: se însămânțează restul probei în mai multe tuburi cu bulion Kitt-Tarozzi regenerat. Se încălzește câte un tub în baie de apă la fierbere timp de 5; 10, respectiv, 20 minute (termorezistența sporilor clostridiali este diferită). Se incubează anaerob la 37°C și se urmărește zilnic mediile însămânțate. *C. perfringens*, specie care sporulează rar, este îmbogățit prin incubarea anaerobă a tuburilor cu bulion la 45—46°C sau prin incubare în bulion cu 100 μg neomicină/ml.

Etapa II. Se urmărește aspectul coloniilor dezvoltate, caracterele hemolizei și, pe placa cu geloză-gălbenuș de ou lactozată, producerea de lecitinază sau lipază și fermentarea lactozei. Dacă mediile de izolare directă sunt acoperite de bacterii invazive, se face repicarea din mediul de îmbogățire pe medii de izolare cu 5% agar pentru a inhiba vâul invaziv.

Se repică colonii sugestive pe geloză-sânge, pentru acumulare de cultură pură.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

■ *Microscopice:* prezența, forma și poziția sporului.

■ Aspectul coloniilor: colonii S sau R hemolitice. *C. perfringens* produce hemoliză de tip «cald—rece»: o primă zonă de hemoliză completă apărută la 37°C se inconjoară cu a doua zonă, mai puțin clară, după menținerea culturii la frigider. Coloniile unor specii

mobile tind să invadeze suprafața mediului (e. g. *C. septicum*, *C. sporogenes*, dar mai ales *C. novyi*). În coloață de geloză moale specia imobilă, *C. perfringens*, formează colonii compacte biconvexe (lenticulare), iar speciile mobile colonii arborescente sau pufoase (cu aspectul pufului de păpădie).

■ **Biochimice.** Pe geloză-gălbenuș de ou se urmărește producerea de lecitază și lipază (opacifiere și, respectiv, strat perlat în jurul coloniilor). Proteoliza se evidențiază prin digerarea plasmăi, a serului coagulat sau lizarea fragmentelor de organe (ficat, carne tocată), din bulionul Kitt-Tarozzi. Însămânțarea în lapte degresat și turnesolat permite urmărirea coagulării și digestiei cheagului. Activitatea zaharolitică se studiază prin însămânțare în baterie de mediu Hiss regenerat și incubat sub ulei de parafină steril (tabelele 22.1 și 22.2).

Taboul 22.1. Caractere diferențiale între clostridii producătoare de lecitază

Caractere	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. novyi</i> tip A	<i>C. novyi</i> tip B	<i>C. perfringens</i>	<i>C. sordelli</i>
Sporul: formă, poziție	OS	OS	OS	OS ¹	OS
Reacții în lapte turnesolat	CD	C	D	CRA	CD
Mobilitate	+	±	±	—	±
Lactoză, fermentarea	—	—	—	+	—
Lipază, producerea de	—	+	—	—	—
Urează, producerea de	—	—	—	—	+
Proteoliză intensă	+	—	—	—	+
Esculină, hidroliza	±	—	—	d	±

Simboluri: «+» — ≥90% din tulpini pozitive; «—» ≥90% din tulpini negative; «±» — 61—89% din tulpini pozitive; d — 40—60% din tulpini pozitive; «±» — 11—39% din tulpini pozitive; O — oval; S — subterminal; C — coagulat; CD — coagulat și digerat; D — digerat; CRA — cheag retractat, alveolar.
¹ Sporulează greu și numai pe medii speciale.

■ **De patogenitate și toxigență.** Injectarea intramusculară la cobai a culturii pure și 25 mg Cl₂Ca (pentru a crea condiții anaerobe) reproduce gangrena monomicrobiană specifică (vezi 22.1.4). Pe un alt animal se efectuează reacția de neutralizare a toxinelor din cultură cu seruri imune antitoxice de specie: anti-*C. perfringens*, anti-*C. novyi* etc.

■ **Antibiograma** poate fi realizată difuzimetric pe plăci incubate anaerob.

Taboul 22.2. Caractere diferențiale între clostridii nonproducătoare de lecitază

Caractere	<i>C. botulinum</i> tip A, B, F (proteolitic)	<i>C. botulinum</i> tip B, E, F (zaharolitic)	<i>C. botulinum</i> tip C, D	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. novyi</i> tip C	<i>C. septicum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tetani</i>
Sporul: formă, poziție	OS	OS	OS	OS	OS	OS	OS	RT
Reacții în lapte turnesolat	D	—C	CD	D	—	CRA	D	—C
Mobilitate	±	+	±	+	—	±	±	+
Acid din:								

Caractere	<i>C. botulinum</i> tip A, B, F (proteolitic)	<i>C. botulinum</i> tip B, E, F (zaharolitic)	<i>C. botulinum</i> tip C, D	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. novyi</i> tip C	<i>C. septicum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tetani</i>
■ glucoză	+	+	+	—	+	+	+	—
■ maltoză	—s	+s	d	—	—	+	—s	—
■ lactoză	—	—	—	—	—	+	—	—
■ zaharoză	—	+s	—	—	—	—	—	—
■ salicină	—	—	—	—	—	d	—	—
■ manitol	—	—	—	—	—	—	—	—
Lipază, producerea de	+	+	+	—	—	—	+	—
Indol, producerea de	—	—	+	—	+	—	—	+
Proteoliză intensă	+	—	—	+	—	—	+	—
Esculină, hidroliza	+	—	—	—	—	+	+	—

Simboluri: «+» — ≥90% din tulpini pozitive; «—» — ≥90% din tulpini negative; «±» — 61—89% din tulpini pozitive; d — 40—60% din tulpini pozitive; «+» — 11—39% din tulpini pozitive; +s — slab pozitiv; —s — negativ sau slab pozitiv. O — oval; R — rotund; S — subterminal; T — terminal; C — coagulat; —C — slab coagulat; D — digerat; CD — coagulat și digerat; CRA — cheag retractat, alveolar.

Toxina α de *C. perfringens* poate fi identificată *in vitro*, dacă pe 1/2 a unei plăci cu geloză-galbenuş de ou se epuizează 5 picături de antitoxină α . După absorbția serului în mediu, se epuizează cultura suspectă peste ambele sectoare ale plăcii. *C. perfringens* va forma în jumătatea acoperită cu antitoxina α colonii lipsite de halou opac.

22.2.2. Metoda rapidă de depistare a *C. perfringens*

Se însămânțează proba de examinat în câte două tuburi cu următoarele trei medii de cultură: bulion Kitt-Tarozzi, lapte degresat și turnesolat, bulion VF cu sulfat. Se încălzește câte un tub cu fiecare mediu la 80°C timp de 20 minute pentru omorârea formelor vegetative, apoi se incubează toate tuburile anaerob la 37°C. La intervale de 3—6 ore se urmăresc rezultatele sugestive:

- creștere de bacili grampozitivi;
- innegrire în bulionul cu sulfat;
- producere de cheag alveolar în laptele turnesolat.

22.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul, tratamentul și profilaxia gangrenei gazoase:

- Ser imun polivalent antitoxic antigangrenos.
- Seruri imune antitoxice monospecifice anti-*C. perfringens*, anti-*C. novyi*, anti-*C. septicum* etc.
- Anatoxina polivalentă antigangrenoasă.

22.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A TOXIINFECȚIILOR ALIMENTARE CAUZATE DE *C. PERFRINGENS*

Se examinează probe de materii fecale, vomă, alimente suspecte pentru izolarea cantitativă a *C. perfringens* sau/și depistarea enterotoxinei; probe de ser sangvin pentru titrarea antienterotoxinei prin contraimmunoelectroforeză sau, mai bine, prin hemaglutinare indirectă.

Criteriile de confirmare a toxiinfecției alimentare prin *C. perfringens* sunt:

1. *Prezumptive*: izolarea *C. perfringens* $\geq 10^5$ UFC/g aliment și $\geq 10^6$ UFC/g fecale.

2. *De certitudine*:

■ Izolarea aceleiași serotip de *C. perfringens* din aliment și fecale de la bolnavi, dar nu de la martori (persoane din colectivitate fără semne de boală).

■ Depistarea prin testul ansei ileale de iepure ligaturată a enterotoxinei în fecale.

■ Creșterea de cel puțin 4 ori a titrului antienterotoxinei în probe de ser recoltate în dinamică.

22.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN TETANOS

Tetanosul trebuie, în primul rând, diferențiat de intoxicația cu stricnină. Aceasta se face obișnuit pe baza anamnezei și tabloului clinic (simptomatologie sugestivă după o plăgă sau administrarea unui implant medicamentos în antecedentele apropiate). Oricum rezultatele examenelor bacteriologice sunt prea tardive pentru decizia terapeutică.

Se prelevă și se examinează: puroi, secreții din plagă, pansamente, medicamente etc.

Microscopia directă rămâne orientativă: frecvent este negativă din cauza numărului redus de bacili tetanici din prelevate; nu diferențiază *C. tetani* de bacili tetanimorfi, nepatogeni.

Izolarea și identificarea este tardivă pentru necesitățile deciziei clinice. Prelevatele sunt încălzite 30 minute la 80°C pentru omorârea florei nesporulate de asociație, apoi îmbogățite prin incubare în bulion Kitt-Tarrozzi. Se epuizează proba îmbogățită pe două plăci cu geloză-sânge Zeissler (agarizată 5% pentru a preveni creșterea invazivă a bacilului tetanic) dintre care una cu ser antitetanic. După incubare anaerobă se urmărește apariția coloniilor transparente, cu tendință invazivă, uzual hemolitice. Pe placa cu ser antitetanic hemoliza este inhibată. Se repică câteva colonii tipice în bulion Kitt-Tarrozzi pentru acumulare de cultură pură necesară identificării.

Identificarea rapidă include studiul:

■ *Caracterelor microscopice*: bacili gramvariabili cu spor sferic terminal (aspect de bolduri sau bețe de tobă).

■ *Caracterelor de cultivare*: organism anaerob cu creștere invazivă pe mediile cu concentrație normală (2%) de agar.

■ *Patogenității*. Se injectează, intramuscular, în membrul posterior, cultura plus 5 mg Cl_2Ca la 2 șoareci dintre care unul protejat cu ser antitetanic. După cca 4 zile șoarecele neprotejat moare cu semne de tetanos.

Biopreparatele folosite pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul tetanosului:

■ Ser heterolog hiperimun antitoxină tetanică.

■ Imunoglobulină umana hiperimună antitetanică.

■ Anatoxină tetanică (monovaccin, bivaccin DT, trivaccin ADTP).

22.5. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A BOTULISMULUI

Botulismul este o urgență terapeutică maximă. De aceea ordinea investigațiilor de laborator este: depistarea și identificarea toxinei, tentativa de izolare și identificare a *C. botulinum*.

Prelevatele patologice indicate sunt: vomă, spălătură gastrică, fecale, sânge, resturi din alimentele suspecte. De la cadavru se examinează conținut gastric și intestinal, sânge, fragmente de ficat. Dacă există o plagă, exsudat și probe bioptice de la acest nivel.

Depistarea și identificarea toxinei botulinice. *Testul de neutralizare*. Se pregătesc prelevatele patologice, după natura lor, prin omogenizare, filtrare sau centrifugare. În eprubete separate, la 1 ml prelevat se adaugă 1 ml ser hiperimun polivalent antibotulinic (200—300 UA), iar la 2,4 ml prelevat câte 0,6 ml ser hiperimun antibotulinic monospecific (anti-A, anti-B, anti-E, anti-F) cu 100—200 UA. Se incubează amestecurile 30 minute la 37°C pentru interacțiunea toxină—antitoxină, după care se injectează, subcutan sau intraperitoneal, câte 2 șoareci cu fiecare amestec prelevat—antitoxină botulinică și 2 șoareci martor cu prelevatul patologic incubat numai cu soluție salină izotonă. Se supraveghează animalele până la 4 zile.

Supraviețuiesc numai animalele injectate cu amestecul prelevat patologic—ser antibotulinic polivalent și cu serul antibotulinic monospecific corespunzător toxinei din prelevat. Restul animalelor, inclusiv martorii, fac paralizii și mor în 1—4 zile.

Metodele rapide pentru depistarea toxinei botulinice sunt:

- Reacția de hemaglutinare indirectă cu eritrocite tanate și sensibilizate prin anticorpii din serurile antibotulinice polivalente și monospecifice de tip.
- Determinarea indecelui fagocitar. Toxina botulinică are activitate leucotoxică și inhibă capacitatea fagocitară. Astfel indicele fagocitar al polimorfonuclearelor din sângele bolnavului scade de 3—20 ori. Dacă adăugăm la proba de sânge cu toxină botulinică serul antibotulinic monospecific omolog, activitatea fagocitară a leucocitelor se restabilește.

Izolarea *C. botulinum* se face pe mediile specificate mai sus, în condiții anaerobe. Cultura pură o identificăm prin studiul caracterelor microscopice, biochimice (tabelul 8.2) și reacția de neutralizare a toxinei. Aceste operații se fac numai de personal vaccinat antibotulinic.

Biopreparatele folosite pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul botulismului:

- Ser antibotulinic polivalent.
- Seruri antibotulinice monospecifice de tip.
- Anatoxină botulinică pentru vaccinare selectivă a personalului de laborator etc.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE BACTERII ANAEROBE NECLOSTRIDIENE

23.1. DATE GENERALE

23.1.1. O minidefiniție

Bacteriile anaerobe nesporulate reunesc numeroase genuri și specii din microflora endogenă normală a organismului, de aceea mai sunt numite și floră endogenă Veillon (A. Veillon a fost bacteriolog francez care a studiat o parte din aceste bacterii). Se diferențiază prin caracterele microscopice (tabelul 23.1), de cultivare, biochimice și sensibilitate la antibiotice.

23.1.2. Repere taxonomice

Bacteriile cu interes medical din flora endogenă Veillon sunt repartizate în unități taxonomice după cum urmează:

- Cocii grampozitivi în genurile *Peptococcus* și *Peptostreptococcus* ale familiei *Peptococcaceae*.
- Cocii gramnegativi în genul *Veillonella* al familiei *Veillonellaceae*.
- Bacilii grampozitivi în mai multe genuri neafiliate: *Actinomyces* (vezi, partea a doua, capitolul 40), *Bifidobacterium*, *Eubacterium* și *Propionibacterium*.
- Bacilii gramnegativi polimorfi în genurile *Bacteroides* și *Fusobacterium* din familia *Bacteroidaceae*.
- Spirocheții în genul *Treponema* din familia *Spirochaetaceae*.

Tabelul 23.1. Bacteriile anaerobe nesporulate ale microflorei normale a organismului

Caractere microscopice	Unități taxonomice	Habitat principal	Implicații patologice
Cocii grampozitivi			
■ așezați în grămezi	<i>Peptococcus niger</i>	Vagin, ombilic	Ocazional asociat în supurații genitale și pelvine

Tabelul 23.1 (continuare)

Caractere microscopice	Unități taxonomice	Habitat principal	Implicații patologice
■ așezați în lanțuri	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Vagin, ocazional în crevasele gingivale normale, intestin	Abcese variat localizate (creier, ureche, mandibulă, pleurale, pelvipertoneale, genitale); osteomielite; bacteriemii
	<i>P. asaccharolyticus</i>	Căi genitale, piele	Abcese peritoneale, cutanate
	<i>P. magnus</i>	Căi urogenitale	Abcese variat localizate, mai ales în zone subdiafragmatice
	<i>P. micros</i>	Căi genitale, crevase gingivale în parodontoză	Abcese variat localizate, mai ales în zone supradiafragmatice
	<i>P. prevotii</i>	Căi genitale	Asociat în supurații ale plăgilor
	<i>P. productus</i>	Colon	Probabil nepatogen
	<i>P. tetradius</i>	Vagin	Asociat în infecții vaginale
Coci gramnegativi	<i>Veillonella parvula</i>	Cavitatea orală, intestin la om și rozătoare	Accidental asociate în piorei alveolare, parodontopatii; gangrenă și abcese pulmonare; infecții postoperatorii
	<i>V. atypica</i>	Ibidem	
	<i>V. dispar</i>	Căile aerodigestive superioare la om, rar la rozătoare	
Bacili grampozitivi			
■ filamentoși ramificați	<i>Actinomyces israelii</i>	Cavitatea orală, ocazional intestin, vagin	Vezi 40.1.6.
	<i>Arachnia propionica</i> ¹	Cavitatea orală, ocazional vagin, conjunctivă	Vezi 40.1.6.
■ cu capete bifurcate	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>A. odontolyticus</i>	Cavitatea orală	Vezi 40.1.6.
	<i>Bifidobacterium</i> (numeroase specii)	Intestinul la om și animale	Nepatogene
	<i>Eubacterium limosum</i>	Intestinul la om și animale	Asociat în abcese rectale, vaginale, supurații ale plăgilor
■ difterimorfi	<i>Eubacterium alactolyticum</i>	Cavitatea orală	Asociat în parodontite, pulpite, celulite jugale, supurații pulmonare, pleurale, abcese cerebrale; infecții postoperatorii
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Abundent în arile seboreice ale pielii la om; intestin	Asociat în acnee, supurații ale plăgilor, abcese; bacteriemii, endocardite subacute
	<i>P. granulosum</i>	Ariile seboreice ale pielii la om	Asociat în acnee
	<i>P. avidum</i>	Arii umede ale pielii: nări, axilă, perineu; rar în arii cu sebum	Probabil nepatogen

Caractere microscopice	Unități taxonomice	Habitat principal	Implicații patologice
Bacili gramnegativi polimorfi	<i>Bacteroides</i>		
	■ Grupul <i>fragilis</i> : <i>B. fragilis</i> <i>B. vulgatus</i> <i>B. distasonis</i> <i>B. ovatus</i> etc.	95—99% din flora colonului; ocazional apar în gură și vagin	Infecții cu origine intestinală: apendicite, abcese rectale, peritonite, infecții postoperatorii în sfera digestivă și urogenitală; bacteriemii cu abcese metastatice, endocardite. <i>B. fragilis</i> are cel mai mare potențial patogen
	■ Grupul <i>melaninogenicus</i> <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. denticola</i> etc. <i>B. distens</i> <i>B. bivius</i>	În principal crevasele gingivale; unele specii apar și în vagin Vagin; ocazional cavitatea orală	Asociați în infecții conecte cavității orale și vaginului
	■ Grupul <i>asaccharolyticus</i> <i>B. asaccharolyticus</i> <i>B. gingivalis</i> <i>B. ureolyticus</i>	Proporție redusă în flora colonului În principal crevasele gingivale	Asociați în infecții conecte vaginului Asociați în infecții conecte cavității orale
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Cavitățile omului și animalelor	Abcese, infecții cu caracter necrotic; bacteriemii
	<i>F. nucleatum</i>	Cavitatea orală a omului	Mai frecvent asociați în infecții conecte cavității orale, căilor respiratorii, ocazional ale plăgilor
	<i>F. varium</i> <i>F. mortiferum</i> ș. a.	Colonul omului și animalelor	Ocazional asociate în abcese necrotice
Spirocheți	Treponeme orale: <i>Treponema denticola</i> etc.	Cavitatea orală: placa dentară, crevase gingivale	Angina Vincent, în asociație cu <i>Bacteroides</i> sp. sau <i>Fusobacterium</i> sp. (asociația fusospirală)
	Treponeme genitale: <i>T. phagedenis</i> etc.	Organe genitale, anus la om și primat	Probabil nepatogenă

¹ Specia *Arachnia propionica* este în prezent afiliată la genul *Propionibacterium* ca *P. propionicum*.

23.1.3. Habitat (tabelul 23.1)

23.1.4. Factori de patogenitate

În general echipamentul patogen al bacteriilor din flora endogenă Veillon este incomplet. Cele mai înzestrate specii cu factori de patogenitate sunt:

■ *Bacteroides fragilis* este singura specie care produce o capsulă polizaharidică, prin care eludează fagocitoza și efectul litic al complementului. Mai posedă și endotoxină și produce o serie de agresine solubile sau asociate membranei externe: proteinaze, inclusiv colagenază, fibrinolizină, neuraminidază, AND-ază, hialuronidază, hemolizină ș. a.

■ *Fusobacterium necrophorum* produce o gamă largă de toxine și agresine: endotoxină, o hemolizină oxigenabilă, leucocidină, lipază, ADN-ază etc.

23.1.5. Receptivitatea la infecții cu bacteriile florei endogene Veillon

Uzual aceste bacterii nu inițiază infecții primare din cel puțin două motive: echipamentul de patogenitate incomplet; oxigenarea țesuturilor și umorilor normale. Chiar și *B. fragilis* sau *F. necrophorum* nu se pot multiplica în prezența oxigenului. De aceea infecțiile cu bacteriile din flora endogenă Veillon au câteva caractere particulare:

- apar la gazde cu apărarea antiinfecțioasă sistemică sau locală compromisă:
- sunt uzual infecții mixte sinergice (e. g. bacilii coliformi consumă oxigenul și creează în țesuturi mediu favorabil dezvoltării *B. fragilis*, care, la rândul său, protejează coliformii de fagocitoză și lezează țesuturile; sumarea factorilor de patogenitate ai bacteriilor asociate). După ce infecția a fost inițiată, bacteria cea mai patogenă poate invada organismul bacteriemic.

23.1.6. Infecțiile determinate de bacteriile florei endogene Veillon

Putem considera următoarele patru categorii ale acestor infecții:

1. *Infecții mixte cu caracter supurativ-gangrenos ale plăgilor sau unor leziuni ale mucoaselor* digestivă, respiratorie ori genitourinară. Prin soluții de continuitate (e. g. perforații intestinale), din aproape în aproape sau pe cale limfatică se pot extinde la cavitățile seroase învecinate: pleură, meninge, peritoneu.

2. *Actinomicoza* (vezi partea a doua, capitolul 40.1.6).

3. *Infecțiile bacteriemice și septicemice* au ca punct de plecare focarul infecțios de la poarta de intrare. Speciile cu potențial invaziv (*B. fragilis*, *F. necrophorum*) generează septicemii și determină mai frecvent metastaze septice. Altele (*Propionibacterium* sp., *Peptostreptococcus*) pot determina bacteriemii cu endocardită subacută sau localizări metastatice supurative.

4. *Bolile fusospirochetoze*. Mucoasele lezate prin carențe nutritive (e. g. scorbut) sau prin viroze (e. g. herpes simplex) ori la pacienți cu hemopatii maligne pot fi invadate de o asociație bacteriană dominată de treponeme orale, *B. melaninogenicus* și *Fusobacterium* sp., rezultând necroze ulcerative: stomatită, angină Vincent.

23.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR ANAEROBE NECLOSTRIDIENE

23.2.1. Diagnosticul microbiologic

Diagnosticul microbiologic este singurul posibil.

23.2.1.1. Prelevarea probelor

Prelevarea probelor impune exigențe deosebite pentru a evita contactul cu oxigenul. Este formal contraindicată prelevarea pe tampon. Se examinează: probe de puroi sau/și sânge aspirate prin puncție, probe bioptice, care sunt introduse în flacoane cu mediu de transport, ermetic închise sub atmosferă de gaze inerte (CO₂, N, H). Probele aspirate pot fi transportate la laborator chiar în seringă după îndepărtarea bulilor de aer și obturarea acului cu un dop de cauciuc (figura 3.2).

23.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă a frotiurilor colorate depistează tipurile morfotinctoriale (tabelul 23.1) din asociațiile polimicrobiene și orientează asupra mediilor de cultură și condițiilor de incubare anaerobe și/sau aerobe.

23.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Izolarea anaerobilor nesporulați este dificilă din cauza exigențelor nutritive și de incubare în absența oxigenului. Cum majoritatea prelevatelor conțin un amestec de bacterii strict anaerobe cu bacterii facultativ anaerobe și/sau aerobe, este contraindicată însămânțarea în bulion tioglicolat, care poate fi invadat de bacteriile facultativ anaerobe, nesemnificative clinic, în defavoarea anaerobilor. De aceea epuizăm probele pe două plăci:

- una cu geloză-sânge anaerobă suplimentată cu extract de levură, hemină, L-cisteină și vitamina K₁;

- alta cu același mediu de bază preparat selectiv prin adaos de kanamicină-vancomicină în prezența cărora *Bacteroides* și *Fusobacterium* cresc.

Poate fi utilizată și o metodă care orientează identificarea anaerobilor neclostridieni în primocultură: se epuizează proba pe o placă cu geloză-sânge anaerobă, apoi se aplică pe suprafața însămânțată rondelile cu colistină, eritromicină, kanamicină, penicilină, rifamicină și vancomicină. Creșterea sau absența coloniilor în jurul rondelilor orientează identificarea bacteroidaceelor.

Etapa II. Se urmărește cel puțin 48 ore culturile incubate la 37°C în anaerobioză strictă. Se repică câteva colonii din fiecare tip sugestiv pe geloză-sânge anaerobă pentru acumularea de cultură pură în vederea identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele prin studiul:

- *caracterelor de cultură* cu creștere exclusiv anaerobă;
- *caracterelor morfotinctoriale*;
- *testului catalazel* cu 6% H₂O₂, negativ;
- *sensibilității la antibioticele* menționate mai sus și la violet de gențiană și taurocolat;
- *pigmentogenezei*: *B. melaninogenicus* formează colonii de culoare neagră;
- *fluorescenței pozitive* la *B. fragilis*;
- *activității biochimice*: formarea de indol, hidroliza esculinei, fermentarea carbohidraților, inclusiv determinarea acizilor grași volatili și acizilor organici nevolatili rezultați din fermentarea glucozei (teste limitate la laboratoarele care dispun de gaz-cromatograf).

Antibiograma pentru necesitățile terapiei se face printr-o variantă a metodei diluțiilor (a nu se confunda cu metoda difuzimetrică utilă numai pentru identificare).

Diagnosticul rapid al infecției cu bacterii anaerobe neclostridiale poate fi realizat prin:

- coroborarea datelor clinice;
- microscopia directă a frotiurilor colorate;
- fluorescența sub raze ultraviolete a suprafeței plăgilor sau a prelevatelor patologice;
- tehnica de cromatografie gaz-lichid a biopsiilor pentru determinarea spectrului de acizi grași volatili și acizi organici caracteristic pentru speciile *Bacteroides*, *Fusobacterium* ș. a.

Tratamentul infecțiilor determinate de anaerobii nesporulați impune intervenție chirurgicală radicală și medicație antimicrobiană (metronidazol, cefotaximă, augmentin etc.).

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE *HAEMOPHILUS*

24.1. DATE GENERALE

24.1.1. O minidefiniție

Genul *Haemophilus* cuprinde cocabacili gramnegativi, polimorfi, imobili, facultativ anaerobi, care atacă zaharurile fermentativ și cresc numai pe medii îmbogățite cu factorii de creștere X (hemină sau alte porfirine) și/sau V (una din cele două coenzime: nicotinamid-adenin-dinucleotid — NAD^+ , sau NAD-fosfat — NADP^+), factori prezenți în sânge, de unde și numele genului.

24.1.2. Repere taxonomice

Haemophilus este un gen al familiei *Pasteurellaceae* având strânse înrudiri cu speciile *Pasteurella* și *Actinobacillus*. *H. influenzae*, cea mai importantă dintre speciile care infectează omul, are 6 serovaruri capsulare (numite de la a la f) și 6 biovaruri (numite de la I la VI). *H. parainfluenzae* are 3 biovaruri (I—III).

24.1.3. Habitat

Unele specii au habitat uman, altele sunt găzduite de diverse animale. În nazofaringe găzduim frecvent *H. influenzae* și mai rar *H. haemolyticus*. În cavitatea orală și faringe sunt uzual prezente *H. parainfluenzae* și *H. parahaemolyticus*. Membri frecvenți ai plăcii dentare sunt: *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* și *H. segnis*. În microflora vaginală apare ocazional *H. parainfluenzae*.

Pentru două din speciile patogene, *H. aegyptius* și *H. ducreyi*, nu se cunosc purtători sănătoși.

24.1.4. Factori de patogenitate

Factorii de patogenitate sunt mai bine studiați la *H. influenzae*. *Capsula* are efecte antifagocitare. Cel mai patogen este serovarul b cu capacități invazive. O *toxină termostabilă* cu efecte ciliostatice asupra epiteliului respirator este produsă de tulpinile serovarului b ca și de tulpini netipabile. *H. influenzae* mai sintetizează *histamină* care poate contribui la inflamația și bronhoconstricția din infecțiile respiratorii pe care le produce.

24.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu *Haemophilus*

H. ducreyi și *H. aegyptius* sunt patogeni primari. Numai serovarul b de *H. influenzae* se manifestă ca patogen primar, invaziv, la copii în vârstă de 3 luni până la cca 4 ani. Până la vârsta de 3 luni copiii sunt protejați pasiv de anticorpii materni antipolizaharidă b, iar după vârsta de 4 ani prin anticorpi proprii elaborați după infecții manifeste sau inaparente cu acest serovar.

Celelalte serovaruri de *H. influenzae* sau tulpinile necapsulate și alte specii de *Haemophilus* sunt condiționat patologice, care determină infecții numai la pacienți cu deficiențe ale barierelor antiinfecțioase locale sau sistemice.

24.1.6. Infecțiile determinate de bacteriile hemofile

Serovarul b de *H. influenzae* determină infecții cu poartă de intrare respiratorie și caracter invaziv: otite medii, epiglotite acute, pneumonii, septicemii, meningite, artrite septică, osteomielite, celulite, pericardite etc. La adult infecții invazive cu *H. influenzae* sunt rare, determinate mai ales de tulpini netipabile.

La copii mari și adulți cu transportul mucociliar al epiteliului respirator deprimat (viroze respiratorii, bronșită cronică, bronșiectazie, fibroză chistică etc.) tulpini capsulate (indiferent de serotip) sau necapsulate de *H. influenzae* colonizează epiteliul respirator și determină bronșite trenante. Meningite ale adultului cu tulpini netipabile de *H. influenzae* au fost semnalate după traumatisme craniene, otite medii, sinuzite.

H. ducreyi cauzează șancrul moale, o boală cu transmitere sexuală mai răspândită în regiunile tropicale și subtropicale. *H. aegyptius* este cauza unor conjunctivite acute, rar a unor infecții invazive.

Celelalte specii de *Haemophilus*, cu un potențial patogen redus, determină uneori endocardite subacute.

24.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN INFECȚIILE CU *HAEMOPHILUS*

24.2.1. Diagnosticul microbiologic

24.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de localizarea infecției, se examinează: exsudat nazofaringian, exsudat conjunctival, spută, lichid cefalorahidian, sânge, puroi articular, exsudat din ulcerări genitale.

24.2.1.2. Microscopia directă

În contextul reacției inflamatorii cu polimorfonucleare se depistează numeroși cocobacili gramnegativi polimorfi, eventual capsulați.

În frotiurile din exsudatul ulcerărilor șancroide, *H. ducreyi* apare sub formă de cocobacili, de mici bacili bondoci colorați bipolar sau ca bacili subțiri dispuși în grămezi, sau în lanțuri paralele printre celule, sau în lungul filamentelor de mucus (aspectul «lanțului de bicicletă» sau a «bancului de pești»).

24.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează probele pe o placă cu geloză Loewinthal sau geloză-ciocolată și pe o placă cu geloză-sânge cu incubare peste noapte la 37°C în atmosferă cu 5—10% CO₂.

Etapa II. Se urmărește apariția de colonii mici transparente ca picăturile de rouă. Se repică câteva colonii pe unul din mediile speciale cu factori X și V, pentru a se obține cultura pură stock necesară indentificării.

Etapa III. Se identifică tulpina izolată prin studiul:

- **Caracterelor morfotinctoriale** (vezi mai sus).
- **Caracterelor de cultivare:** colonii caracteristice (vezi mai sus) numai pe mediile speciale, geloză Loewinthal sau geloză-ciocolată, absente pe placa cu geloză-sânge.
- **Dependenței cultivării de prezența factorilor de creștere X, V și a CO₂.** La speciile dependente de factorul V se observă fenomenul de satelitism: în imediata vecinătate a culturii de *Staphylococcus aureus* (e. g. un striu de cultură confluentă înșămăntat peste aria de epuizare a tulpinii de identificat) coloniile de *H. influenzae* sunt mai mari și devin tot mai mici, până la dispariție, pe măsură ce distanța față de cultura de *S. aureus* crește.
- **Caracterelor biochimice:** producerea de catalază, urează, indol, ornitindecarboxilază, fermentarea zaharurilor (tabelul 24.1).

Tabelul 24.1. Caractere diferențiale ale speciilor umane de *Haemophilus*

Specii	Necesitatea pentru creștere de			Hemo-liză	Indol	Orni-tin-decar-boxil-ază	Urează	Cata-lază	Acid din		
	X	V	CO ₂						gluco-ză	zaha-roză	lacto-ză
<i>H. influenzae</i>	+	+	—	—	v	v	v	+	+	—	—
<i>H. aegyptius</i>	+	+	—	—	—	—	+	+	(+)	—	—
<i>H. parainfluen-zae</i>	—	+	—	—	—	v	v	d	+	+	—
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	d	—	+	+	+	—	—
<i>H. parahaemolyticus</i>	—	+	+	+	—	d	+	d	+	+	—
<i>H. segnis</i>	—	+	—	—	—	—	—	d	+s	+s	—
<i>H. aphrophilus</i>	+	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	—	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	—	—	(d)	—	—	—	—	(d)	—	—

Simboluri: ++ — ≥ 90% din tulpini pozitive; +- — ≥ 90% din tulpini negative; d — 11—89% din tul-pini pozitive; v — variabil cu biovarul tulpinii; () — reacții pozitive tardive; s — reacții slab pozitive.

Se identifică serovarul de *H. influenzae* prin aglutinare pe lamă cu seruri monospecifice a—f.

Antibiograma este necesară și se efectuează pe geloză-ciocolată.

24.2.2. Metode rapide de diagnostic

Metodele rapide de diagnostic sânt:

- Depistarea antigenului capsular b de *H. influenzae* în lichidul cefalorahidian, ser sau urină prin latex-aglutinare.
- Reacția de umflare a capsulei pe trotiul direct tratat cu ser imun anti-*H. influenzae* specific de serovar.

24.2.3. Biopreparate

- Seruri imune anti-*H. influenzae* monospecifice de serovar.
- Rondele cu factori de creștere X și V.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Difteria este o toxiinfecție acută, contagioasă, a copiilor sau adulților, cauzată de *Corynebacterium diphtheriae*

25.1. DATE GENERALE

25.1.1. O minidefiniție

Corinebacteriile sunt bacili grampozitivi, cu granule metacromatice, măciucați, dispuși în unghiuri și palisade. Imobili, nesporulați, neacidorezistenți. Facultativ anaerobi, dar unele specii sunt aerobe, oxidazonegativi și catalazopozitivi. Atacă zaharurile fermentativ sau deloc.

25.1.2. Repere taxonomice și habitat

Genul *Corynebacterium* reunește numeroase specii, unele cu tropism uman, altele patogene pentru animale sau pentru plante.

Speciile cu tropism uman. Mai cunoscută este *C. diphtheriae*, cauza difteriei. *C. minutissimum* determină o afecțiune cutanată: eritasma. *C. mycetoides* poate produce ulcere cutanate tropicale.

O serie de specii comensale în microflora tegumentului și mucoaselor pot determina infecții la gazda imunocompromisă: septicemii, endocardite, pneumonii. Așa sunt: *C. xerosis*, *C. jeikeium* (specie particularizată prin rezistența la multiple antibiotice). *C. pseudodiphthericum*, găzduită în nazofaringe, și *C. matruchotii*, component al plăcii dentare, sunt comensale nepatogene.

Puține din speciile patogene pentru animale infectează accidental omul. Așa sunt: *C. pseudotuberculosis* sau *C. ulcerans*.

C. diphtheriae are 3 biovaruri: *gravis*, *mitis* și *intermedius* cu peste 50 serovaruri și multiple lizovaruri. Bacilii difterici sunt rezistenți la uscăciune. În fragmente de falsă membrană și secreții nazofaringiene uscate și la adăpost de lumină supraviețuiesc mai multe luni. De aceea difteria se poate transmite și prin pulberi contaminate.

Surse de infecție în difterie sunt omul bolnav și purtătorii sănătoși de tulpini toxigene ale bacililor difterici.

25.1.3 Factori de patogenitate

C. diphtheriae este o bacterie toxigenă prin conversie lizogenică. Tulpinile agresive elaborează enzime ca hialuronidaza, neuraminidază, care favorizează difuziunea toxinei de la poarta de intrare a infecției.

Toxina difterică este un inhibitor al sintezei proteice cu efecte necrotice la poarta de intrare a infecției și în țesuturi, unde difuzează pe cale sangvină. O toxină identică produc tulpini lizogene de *C. ulcerans*.

25.1.4. Receptivitatea la infecțiile cu corinebacterii

Toate persoanele cu mai puțin de 0,01 unități antitoxină difterică/ml ser sunt receptiv la difterie.

Receptivitatea la bacilii difterimorfi din microflora normală a fost precizată mai sus.

25.1.5. Difteria

Poarta de intrare uzuală a infecției este faringele. Rar, mai ales în condiții de promiscuitate, poarta de intrare poate fi conjunctiva, plăgile sau vulva. Toxina difterică necrozează epiteliul și țesutul subiacent la poarta de intrare. Bacilii difterici se multiplică în țesutul necrotic, unde rămân cantonați, iar toxina difuzează în organism pe cale sangvină. Un exsudat fibrinos infiltrat cu leucocite polimorfonucleare și hematii cuprinde țesutul necrotic, formând la suprafața leziunii o falsă membrană cu aspectul unui depozit cenușiu, a cărui detașare, dificilă, lasă o suprafață sângerândă. Falsa membrană are tendința la extindere. Când cuprinde laringele (*crupul difteric*) duce la asfixie. Ganglionii limfatici cervicali și țesuturile gâtului sunt edemațiate. Semnelor locale li se asociază fenomene generale: febră, stare toxică. Toxina difterică determină leziuni necrotice în miocard (*miocardita difterică*), rinichi, glandele suprarenale, nervi (*polinevrita difterică*). Pacienții au leucocitoză cu neutrofilie. În formele hipertoxice apare un sindrom hemoragic, iar pacienții mor în 24—48 ore prin miocardită difterică, supraviețuitorii fac paralizii ale vălului palatin, mușchilor oculari sau extremităților.

25.2. INVESTIGAȚII DE LABORATOR PENTRU CONFIRMAREA DIFTERIEI

Data fiind gravitatea bolii, prezumția clinică hotărăște terapia specifică a difteriei. Examenul bacteriologic confirmă sau infirmă acest diagnostic într-un interval în care actul terapeutic este deja consumat.

25.2.1. Diagnosticul microbiologic

25.2.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă trei tamponane prin detașarea unei porțiuni marginale din falsa membrană (amigdaliană, conjunctivală, vulvară sau a unei plăgi) și un tampon nazofaringian pe cale nazală.

Pentru depistarea portajului, se prelevă 2 tampoane: unul nazofaringian și unul faringian.

Cu primul tampon prelevat din leziune se efectuează extemporaneu 2 frotiuri, care după fixare, sunt expediate la laborator împreună cu celelalte tampoane. Dacă examinarea întârzie mai mult de 2 ore, se vor imersa tampoanele într-un mediu de transport: geloză semilichidă 0,1% cu 10% ser sangvin și telurit de potasiu sau OCST (ou-cistină-ser-telurit de potasiu), care pot funcționa și ca medii de îmbogățire.

25.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă se efectuează pe cele două frotiuri: unul colorat Neisser, celălalt Gram. În contextul reacției inflamatorii cu polimorfonucleare se urmărește prezența de bacili drepecți sau incurbați, cu capete măciucate, așezați în unghiuri și palisade, ca literele chinezești, cu granule de volutină (corpusul Babeș-Ernst) dispuse polar și colorate metacromatic în albastru pe fondul galben-brun al bacililor în colorația Neisser. Pe frotiul colorat Gram, bacilii difterici apar gramvariabil cu granulele de volutină violetă pe fondul bacterian roșu.

Valoarea microscopiei directe este orientativă din cauza asemănării morfologice a *C. diphtheriae* cu bacilii difterimorfi. Oricum, microscopia diferențiază angina difterică de cea ulceronecrotică Plaut-Vincent, determinată de o asociație fusospirochetozică.

25.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Al doilea tampon se epuizează pe:

- o placă cu mediu selectiv diferențial, Tinsdale (geloză-ser-cistină-telurit de potasiu-sulfat), sau Bucin (geloză-sânge cu hinozol), cu incubare la 37 °C timp de 24—48 ore,
- o placă cu geloză-sânge cu incubare peste noapte la 37°C.

Dubla însămânțare se impune din două motive:

- Se controlează calitatea prelevării. Pe mediul selectiv poate să nu apară cultură; dacă aceasta lipsește și pe geloză-sânge prelevatul a fost necorespunzător.
- Unele angine streptococice simulază difteria, caz în care însămânțarea numai pe mediul selectiv dă rezultat fals negativ.

În fine, unele forme grave ale difteriei se datorează infecției mixte bacil difteric—*S. pyogenes*.

Al treilea tampon prelevat din leziune, ca și tamponul nazofaringian sunt imersate și incubate în mediul OCST pentru îmbogățire peste noapte la 37°C. A doua zi se epuizează prelevatul îmbogățit pe mediul selectiv de izolare. La fel se procedează și cu cele două tampoane prelevate de la purtători.

Etapa II. Se examinează culturile de pe mediul selectiv urmărind coloniile suspecte de bacili difterici: colonii negre cu halou brun pe mediul Tinsdale sau colonii albastre pe mediul Bucin. Se repică pe mediul Loeffler (bulion glucozat 1% ser de bou coagulat în pantă) câteva colonii suspecte, bine izolate, pentru a obține, după incubare peste noapte la 37°C, cultura stock necesară identificării. Pe mediile cu telurit de potasiu coloniile unor specii de stafilococ sunt asemănătoare cu cele ale bacililor difterici. De aceea, înainte de repicarea pentru cultura pură, fiecare colonie de pe mediul selectiv cu telurit de potasiu va fi controlată microscopic, pentru a le evita pe cele de stafilococi.

Pe mediul Loeffler bacilii difterici cultivă preferențial în 14—18 ore, formând colonii mici, opace, cu aspectul picăturilor de spermanțet.

Tabelul 25.1. Caractere diferențiale între bacilul difteric și alte corinebacterii

Specia	Cistinază	Urează	Fosfatază	Acid din	
				glucoză	galactoză
<i>C. diphtheriae</i> ¹ :					
■ <i>gravis</i>	+	—	—	+	+
■ <i>intermedius</i>	+	—	—	+	+
■ <i>mitis</i>	+	—	—	+	+
<i>C. jeikeium</i>	—	—	NC	+	+
<i>C. matruchotii</i>	—	d	—	+	—
<i>C. minutissimum</i>	—	—	+	+	NC
<i>C. mycetoides</i>	—	—	+	—	—
<i>C. pseudodiphthericum</i>	—	+	—	—	—
<i>C. xerosis</i>	—	—	—	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	—	+	+
<i>C. ulcerans</i>	+	+	—	+	+

Simboluri: ↔ — 90% sau mai mult din tulpini pozitive; ↔ — 90% sau mai mult din tulpini negative;
d — 11—89% din tulpini pozitive; NC — necomunicat.

Etapa III. Se identifică izolatele prin:

a) Studiul caracterelor microscopice pe frotiu colorat Neisser și Gram. Bacilii difterici au morfologia tipică de bacili corineformi cu numeroase granule de volutină dispuse polar numai în cultura pe mediul Loeffler sau în falsa membrană.

b) Studiul caracterelor de cultură pe mediile cu telurit de potasiu coroborat cu activitatea biochimică permite identificarea celor 3 biovaruri de *C. diphtheriae* (tabelul 25.1).

c) Studiul caracterelor biochimice:

■ **Testul cistinazei (Pizu).** Hidrogenul sulfurat eliberat din cistină sub acțiunea cistinazei produse de bacilii difterici reacționează cu acetatul de plumb și formează sulfură de plumb neagră. Izolatele sunt însămănțate prin înțepare în coloană de geloză-ser cu cistină și acetat de plumb. Innegrirea traiectului de însămănțare cu halou cafeniu după incubare peste noapte semnifică un test pozitiv. Cistinază produc numai bacilii difterici și *C. ulcerans*. Restul bacililor difterimorfi dau testul negativ.

■ **Testul ureazei** este negativ pentru bacilii difterici și variabil la speciile difterimorfe.

■ **Testul fosfatazei** este negativ pentru *C. diphtheriae* și variabil cu specia de bacili difterimorfi.

■ **Fermentarea zaharurilor** (glucoză, maltoză, zaharoză etc.) și polizaharidelor (dextrină, amidon) diferențiază nu numai speciile de corinebacterii, ci și biovarurile bacilului difteric (tabelul 25.1).

■ **Testul hemolizei** este pozitiv pentru biovarul *mitis* al bacililor difterici.

Specia	Acid din				
	manitol	maltoză	zaharoză	glicogen	amidon
<i>C. diphtheriae</i> ¹ :					
■ <i>gravis</i>	+	+	—	+	+
■ <i>intermedius</i>	+	+	—	+	—
■ <i>mitis</i>	+	+	—	d	—
<i>C. jeikeium</i>	—	—	—	NC	NC
<i>C. matruchotii</i>	+	+	+	+	—
<i>C. minutissimum</i>	d	+	+	NC	—
<i>C. mycetoides</i>	—	—	NC	—	NC
<i>C. pseudodiphthericum</i>	—	—	—	—	—
<i>C. xerosis</i>	+	—	+	—	—
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	d	d	—
<i>C. ulcerans</i>	NC	+	—	d	+

¹ Biovarurile de *C. diphtheriae*, aspectul coloniilor:

- pe geloză-sânge cu cistină și telură de potasiu:
- *gravis*: cenușiu-închis, mari, plate, uscate crenelate («floare de margareta»);
- *intermedius*: cenușii cu centrul negru, acuminat uscat;
- *mitis*: negre, mici, lucioase, bombate;
- pe mediul Tinsdale biovarurile *gravis* și *mitis* formează halou brun după 24 ore, *intermedius* după 48 ore.

d) **Structura antigenică.** Reacții de aglutinare cu seruri polivalente și monospecifice identifică bacilii difterici și serovarurile lor, care pot fi folosite ca markeri epidemiologici.

e) **Lizotiparea** tulpinilor toxigene și netoxigene de bacili difterici este necesară în scopuri epidemiologice: stabilirea tulpinilor epidemigene circulante, investigații în focarele de difterie.

f) **Testul toxigenezei** finalizează identificarea tulpinilor de *C. diphtheriae* izolate de la bolnavi sau de la purtători, pentru că numai acestea sunt patogene.

■ **Testul de toxigeneză in vitro (testul Elek)** — vezi 25.2.2.1. Tulpinile toxigene dau testul pozitiv în 24—48 ore (rareori după 72—120 ore).

■ **Testul de toxigeneză in vivo** este un test de neutralizare efectuat pe cobai sau iepuri. Se inoculează cultura de 24 ore în bulion sau suspensie în bulion a culturii de pe mediul Loeffler.

Pentru **testul subcutanat** se inoculează la 2 cobai, în regiunea abdominală, 2 ml din cultura tulpinii testate, unul din cobai fiind protejat cu 2 ore înainte prin injectarea intraperitoneală a 1000 U antitoxină difterică. Animalele sunt urmărite de la 24 ore până la 30 zile. Cobaiul neprotejat face fenomene specifice intoxicației difterice: moartea în 24—96 ore cu necroză și edem gelatinos la locul de inoculare, congestia capsulelor suprarenale, congestie cu acumulare de exsudat în pleură, pericard, peritoneu. În cazul tulpinilor slab patogene cobaiul supraviețuiește mai mult, cu escară locală, pierdere progresivă în greutate și paralizii după 15—20 zile de la inoculare. Cobaiul martor, protejat specific, rămâne indemn.

Intradermic se pot testa 8—10 tulpini pe un cobai și 15—20 tulpini pe un iepure. Testul pe iepure este cel mai sensibil. Se injectează, în puncte separate, pe jumătatea dreaptă a spatelui depilat, câte 0,1 ml cultură la iepuri și 0,2 ml la cobai. După 4 ore se injectează intravenos 2000 U antitoxină difterică la iepure și 1000 UA intraperitoneală la

cobai, iar după 10 minute se inoculează intradermic pe jumătatea stângă a spatelui, în poziții similare, cultura aceluiași tulpini. Între tulpinile injectate una trebuie să fie sigur toxigenă: martorul pozitiv. Reacția pozitivă: eritem, infiltrat, necroză dermică în punctul de inoculare din jumătatea dreaptă cu absența leziunii în punctul simetric din jumătatea stângă a spatelui.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză: c. g. «Se confirmă diagnosticul de difterie prin izolarea de *C. diphtheriae* toxigen» sau «Hemocultura izolează *Corynebacterium jeikeium* rezistent la următoarele antibiotice ... și sensibil numai la ...».

25.2.2. Controlul receptivității la difterie și eficienței vaccinării

Intradermoreacția Schick controlează receptivitatea la difterie. Pe fața antebrațului drept se inoculează intradermic 0,2 ml toxină Schick (toxină difterică stabilizată și diluată pentru a conține 1/50 DLM cobai/0,2 ml), iar la antebrațul stâng, în poziție simetrică, se inoculează, ca martor, 0,2 ml toxină Schick inactivată termic. Reacția se citește după 48 ore, urmărind intensitatea și diametrul zonei congestiv-infiltrative de la locul de inoculare a toxinei și martorului. *Reacția pozitivă:* zonă congestiv-infiltrativă cu diametrul de peste 10 mm numai la locul de inoculare a toxinei; traduce receptivitatea la difterie. *Reacția negativă:* nici o modificare la locul de inoculare a toxinei; traduce imunitatea la difterie, toxina a fost neutralizată.

O zonă congestiv-infiltrativă atât la locul de inoculare a toxinei, cât și a martorului traduce sensibilizarea la toxină fie a unei persoane imune, fie a uneia receptivă la difterie. Dacă în 96 ore după inoculare congestia și infiltrația dispar la ambele antebrațe, este *pseudoreacție*. Dacă dispar la martor, dar persistă la locul de inoculare a toxinei este *reacție combinată*; persoana fiind receptivă la difterie și sensibilizată, trebuie vaccinată cu doze fracționate.

În suspiciunea difteriei la adulți cu starea generală nealterată, tratamentul specific cu antitoxină difterică se poate temporiza așteptând rezultatul testului Schick. Un test negativ exclude diagnosticul de difterie.

Eficiența vaccinării antidifterice se poate controla prin i. d. r. Schick sau prin reacția de hemaglutinare indirectă (care utilizează ca antigen hematii tanate sensibilizate cu anatoxină difterică), reacția de neutralizare ori ELISA. Testul Schick negativ sau prezența a peste 0,01 UA/ml ser semnifică eficiența vaccinării.

25.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul specific al difteriei

- Seruri aglutinante antidifterice polivalent și monospecifice pentru identificarea antigenică a serovarurilor.
- Set de bacteriofagi antidifterici pentru lizotipia culturilor de *C. diphtheriae*.
- Ser antidifteric hiperimun heterolog. Serul terapeutic este conservat prin fenol (vezi tabelul 2.6). Pentru testul Elek este necesar ser antidifteric nefenolat.
- Imunoglobuline umane hiperimune antidifterice.
- Anatoxină difterică (monovaccin), anatoxină difterică plus anatoxină tetanică (bivaccin), pentru revaccinări sau trivaccinul antidifterotetanopertussis pentru primovaccinarea copiilor.
- Toxină difterică purificată Schick pentru testarea intradermică a receptivității la difterie.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE

Tusea convulsivă este o boală infecțioasă acută și contagioasă, cauzată de *Bordetella pertussis*. Atacă de obicei copiii, determinând o bronșită alergizantă, care evoluează mai multe săptămâni cu accese paroxistice de tuse spasmodică. Sindroame asemănătoare, dar mai benigne, pot provoca alte specii de *Bordetella*, unele adenovirusuri, virusul respirator sincițial sau paragripal.

26.1. DATE GENERALE

26.1.1. O minidefiniție

Bordetelele sunt cocobacili gramnegativi, imobili (două specii) sau mobili (o specie). Aerobi, oxidazopozitivi, catalazovariabili. Pe mediul Bordet-Gengou formează colonii perlate înconjurate cu o zonă de hemoliză fără margini definite. Nu atacă zaharurile în medii cu peptonă.

26.1.2. Repere taxonomice și habitat

Genul *Bordetella* reunește patru specii:

- *B. pertussis*, care parazitează căile respiratorii ale omului ca agent etiologic al tusei convulsive;
- *B. parapertussis*, altă specie umană care determină sindroame mai benigne de tuse convulsivă;
- *B. bronchiseptica*, care parazitează căile respiratorii ale unei varietăți de animale domestice sau sălbatice și imbolnăvește numai rar omul;
- *B. avium*, care parazitează căile respiratorii ale curcanilor fără a fi semnalată patogenă pentru om.

Sursă de infecție sunt bolnavii și purtătorii sănătoși. Foarte sensibile în mediul extern, aceste bacterii se transmit prin picături Flugge și secreții nazofaringiene.

26.1.3 Factori de patogenitate

Bordetella pertussis posedă următorii factori de patogenitate:

a) *Liganzi*, care, prin tropismul lor pentru ciliile epitelului respirator, inițiază colonizarea masivă a mucoasei respiratorii. Ligandul major este *hemaglutinina filamentoasă* (HAF), iar cel accesoriu *fimbriile*. HAF eliberată în mediu poate fi captată prin «piraterie» de către pneumococi și *Haemophilus influenzae*, care suprainfectează căile respiratorii inferioare ale pacienților cu tuse convulsivă.

b) *Capsula* cu activitate antifagocitară.

c) Un *complex de toxine* cu acțiuni nocive multiple:

- toxiconecroza mucoasei respiratorii;
- declanșarea reacției inflamatorii locale;
- hipersecreția mucoasă în căile respiratorii;
- leucocitoza (15 000—20 000 leucocite/mm³) cu limfocitoză (peste 60%),
- imunodepresia;
- inhibiția fagocitozei;
- sensibilizarea la histamină;
- hipersecreția de insulină.

Factorii de patogenitate asigură inițierea și evoluția proceselor locale inflamatorii infiltrative, alterarea mucoasei bronșice, suprainfecția bacteriană, alergizarea bronhiilor, hipersecreția de mucus, excitarea continuă a centrului respirator cu declanșarea acceselor paroxistice de tuse, completate cu reacții din partea altor sisteme și organe.

Celelalte specii de *Bordetella* posedă numai o mică parte din echipamentul de patogenitate al *B. pertussis* și niciodată principala exotoxină: pertussigenul.

26.1.4. Receptivitatea la tusea convulsivă

Receptivitatea la tusea convulsivă este generală. La sugari infecția evoluează deosebit de grav, frecvent mortal.

26.1.5. Tusea convulsivă

După o incubajie de 7—12 zile, boala evoluează în trei stadii: cataral, convulsiv și de convalescență, pe o durată de 1,5—3 luni.

În *stadiul cataral* (7—14 zile) semnele clinice, relativ benigne, sunt necaracteristice (catar respirator, strănut, tuse), dar pacienții sunt foarte contagioși, *B. pertussis* fiind prezentă în mari cantități în nazofaringe.

Stadiul convulsiv (2—4 săptămâni). Starea generală a pacienților se alterează progresiv și, caracteristic, apar accesele de tuse spasmodică, epuizantă, care se asociază cu cianoză, vărsături, eventual convulsii. La sfârșitul accesului de tuse, pacienții expectorează, greu, o cantitate redusă de spută vâscoasă. După 3—4 săptămâni de la debutul bolii pacientul devine necontagios, în sânge crește titrul anticorpilor până în săptămânile 8—9 de boală.

Stadiul de convalescență (cca 4 săptămâni). Lent, accesele de tuse se răresc și scad în intensitate, dar vărsăturile mai pot persista ca fenomen reflex condiționat.

26.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A TUSEI CONVULSIVE

26.2.1. Diagnosticul microbiologic

26.2.1.1. Prelevate patologice

Cât timp pacienții sunt contagioși (primele 3—4 săptămâni de boală) se prelevă mucozitățile nazofaringiene cu un tampon pernazal. Alte prelevate, sputa (dificil și tardiv obținută), picăturile Flügge prelevate pe «placă tușită», sunt mai puțin satisfăcătoare.

Data fiind marea sensibilitate a *B. pertussis* la desicare, exsudatul nazofaringian îl prelevăm pe tampon imbibat cu mediul de transport Kuznețov (soluție de tampon fosfat, cu pH 7,0, cu 0,5% agar-agar și 0,2% cărbune de lemn activat). Pentru transport, tamponul imersat în mediul Kuznețov permite supraviețuirea bordetelelor până la 5—6 ore.

Metoda «plăcilor tușite» asigură însămănțarea picăturilor Flügge direct pe suprafața mediului de cultură (vezi mai jos) cu antibiotic (4—6 UI penicilină sau 2,5 μ g meticilină/ml) din placa Petri, expusă deschisă la 10—12 cm de gura pacientului în cursul accesului de tuse.

Proporția izolării *B. pertussis* scade de la 95—80% în săptămânile 1—2 de boală, la 40—20% în săptămânile 2—3 și sub 20% în săptămânile 3—4.

26.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă pe frotiuri din mucozitățile nazofaringiene sau spută colorate cu ser imun fluorescent anti-*pertussis* și anti-*parapertussis* permite depistarea și identificarea rapidă a speciilor respective.

26.2.1.3. Izolarea și identificarea

Prin izolare și identificare pot fi confirmate până la 80—90% din cazurile de tuse convulsivă surprinse în stadiul cataral. Ulterior procentul izolărilor scade progresiv.

Etapa I. Se epuizează tamponul cu exsudat nazofaringian sau sputa pe mediul Bordet-Gengou sau geloză-cazeină-sânge-cărbune activat, care conțin 4—6 UI penicilină sau 2,5 μ g meticilină/ml, pentru inhibiția bacteriilor grampozitive de contaminare, cu incubare la 37°C, în atmosferă umedă, timp de 7 zile.

Etapa II. Se urmărește zilnic apariția coloniilor caracteristice. Coloniile de *Bordetella* sunt bombate, perlate cu aspectul picăturilor de mercur, cu hemoliză fără limite, precise. *B. pertussis* crește cel mai lent, abia după 3 zile, cu colonii mici. *B. parapertussis* crește în 1—2 zile și formează colonii mai mari. Coloniile de *B. bronchiseptica* apar a doua zi și sunt cele mai mari.

Se repică 3—15 colonii tipice sau suspecte, pentru a se obține cultura stock pe pantă în vederea identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza caracterelor prezentate în tabelul 26.1:

Tabelul 26.1. Caractere diferențiale între speciile *Bordetella*

Testul	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>
Creșterea pe mediul:				
■ Bordet-Gengou	+ (3 zile)	+ (1—2 zile)	+ (1 zi)	+ (1 zi)

Testul	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>
■ Mac Conkey	—	+	+	+
■ geloză cu peptonă	—	+	+	+
Tirozinază ¹	—	+	—	—
Oxidază	+	—	+	+
Urează	—	+	+ ²	—
Nitratază	—	—	+	—
Citrat, utilizare	—	d	+	d
Mobilitatea	—	—	+	+

Simboluri: ↔ — 90% sau mai multe din tulpini pozitive; ↔ — 90% sau mai multe din tulpini negative;
d — 11—89% din tulpini pozitive.
¹ Pigmentogenează pe geloză cu peptonă (innegrire).
² Reacție pozitivă după 4 ore.

a) *Microscopice*: cocobacili gramnegativi cu sau fără capsulă. *B. pertussis* și *B. parapertussis* sunt imobile. *B. bronchiseptica* este mobilă.

b) *Caractere de cultură*: La izolarea din organism, *B. pertussis* nu crește pe medii cu peptonă; celelalte specii cresc, inclusiv pe mediul Mac Conkey, care conține și săruri biliare.

c) *Teste biochimice*. Caractere de gen: inerția fermentativă. Caractere diferențiale între specii: scindarea tirozinei, utilizarea citratului, producerea de urează, reducerea nitraților în nitriți, producere de catalază, oxidază.

d) *Identificarea antigenică* a izolatelor o facem cât mai curând după izolare, pentru a evita degradarea antigenică prin subcultivări repetate. Se utilizează seruri monospecifice în reacții de aglutinare sau imunofluorescență.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele testelor de identificare și se redactează buletinul de analiză cu precizarea dacă au fost izolate sau nu *Bordetella* și anume care specie.

26.2.2. Diagnosticul imunologic

26.2.2.1. Metoda serologică

Anticorpilor anti-*Bordetella* apar abia în săptămânile 2—3 ale bolii și titrul lor crește progresiv până în săptămânile 8—10.

Se prelevă două probe de ser, în dinamică, la interval de 3 săptămâni. Cum sindromul de tuse convulsivă este poli etiologic, indicată inițial este reacția de fixare a complementului cu baterie de antigeni care includ: antigenii *B. pertussis* și *B. parapertussis* alături de antigenii adenovirali, virusuri respirator sincițial și paragripal. Semnificativă este creșterea de cel puțin 4 ori a titrului față de unul din antigenii etiologici posibili.

Anticorpilor anti-*Bordetella* pot fi depistați prin reacții mai sensibile: de aglutinare (titruri semnificative de peste 1:80), de hemaglutinare indirectă (titruri semnificative de cel puțin 1:80 — 1:160) sau ELISA.

26.2.2.2. Intradermoreacția Flossdorf

Această reacție depășește sensibilizarea de tip întârziat, care apare la convalescenții de tuse convulsivă față de alergenul specific al *B. pertussis*.

Desigur, diagnosticul imunologic al tusei convulsive are numai o valoare retrospectivă cu interes mai mult pentru epidemiolog.

26.2.3. Biopreparate și medicamente utilizate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul tusei convulsive

- Seruri imune aglutinante și fluorescente antipertussis și antiparapertussis, pentru identificarea culturilor de *Bordetella*.
- Aglutinogen pertussis și parapertussis; baterie de antigeni fixatori de complement pentru serodiagnostic.
- Monovaccinul inactivat antipertussis sau trivaccinul difterotetanopertussis pentru profilaxie.
- Estolat de eritromicină pentru tratamentul antimicrobian.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI ȘI MICOBACTERIOZELOR

27.1. DATE GENERALE

27.1.1. O minidefiniție

Micobacteriile sunt bacili cu înveliș ceros, care le conferă acidorezistență. Nesporulați și imobili. Strict aerobi, atacă zaharurile oxidativ.

27.1.2. Repere taxonomice și habitat

Genul *Mycobacterium* reunește numeroase specii, larg răspândite în natură, pe care le putem grupa în:

- Specii patogene pentru om. Bacilii tuberculozei sunt reprezentați de *M. tuberculosis*, *M. africanum* (specii antropofile) și *M. bovis* (specie zooantropofilă). Bacilul leprei, *M. leprae*, este singura micobacterie care nu a putut fi cultivată.

- Specii condiționat patogene, numite în trecut micobacterii «atipice» din cauza caracterelor diferite de ale micobacteriilor patogene cunoscute. La om determină accidental infecții asemănătoare tuberculozei, numite generic micobacterioze. Unele specii sunt patogene pentru păsări, ca *M. avium*. Altele sunt saprofite din sol și ape de suprafață, ca *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*. În fine, altora nu le cunoaștem sursa: *M. kansasii*.

- Specii saprofite pe învelișurile omului, ca *M. smegmatis*, *M. gastri*, sau în mediul ambiant, ca *M. phley*.

27.1.3 Factori de patogenitate

Micobacteriile patogene sau condiționat patogene sunt bacterii facultativ intracelulare cu mare capacitate sensibilizantă pentru organismul infectat.

Mai bine studiați sunt factorii de patogenitate ai bacililor tuberculozei. Tuberculolipidele, care reprezintă până la 23% din greutatea uscată a acestor bacili, persistă timp îndelungat în țesuturi și imprimă caractere particulare reacției inflamatorii: sub acțiunea fosfatidilcolinei macrofagele se metaplaziază în celule epitelioide, iar sub acțiunea acizilor micolici în celule gigante multinucleate (celule Langhans) caracteristice granulomului tuberculos (vezi mai jos). Un sulfolipid, propriu tulpinilor virulente, este numit cordfactor, pentru că induce cultivarea bacililor sub formă de cosițe sau corzi în unele medii cum sunt cele cu sânge hemolizat (Șkolnikov etc.). Tuberculoproteinele pure

inoculate la un animal fără infecție tuberculoasă determină sensibilizare anafilactică, dar în complexul natural cu tuberculolipide induc sensibilizare de tip IV, care explică abundența limfocitelor în granulomul tuberculos.

27.1.4. Receptivitatea la tuberculoză și micobacterioze

Receptivitatea la infecția tuberculoasă este generală. Crește semnificativ la anumite vârste (0—6 ani, pubertate, bătrâni) și sub influența unor factori de mediu (infecții anergizante, carențe nutritive, alcoolism, agenți imunosupresivi) sau boli de fond (diabet, silicoză).

Micobacteriozele, altele decât tuberculoza, apar în condiții care scad rezistența antiinfecțioasă a organismului (silicoză etc.).

27.1.5. Infecția tuberculoasă și micobacteriozele

În cca 90% din cazuri infecția tuberculoasă este contractată prin inhalarea bacililor vehiculați prin aerosol și pulberi bacilifere. În restul cazurilor transmiterea este pe cale digestivă sau prin contact.

Primoinfecția tuberculoasă. Inițial, la poarta de intrare, bacilii tuberculozei determină un focar inflamator exsudativ nespecific. O dată cu răspunsul imun celular al gazdei, leziunea inflamatorie exsudativă evoluează în leziune granulomatoasă. Pe secțiune, *granulomul tuberculos* prezintă trei zone distincte: centrală cu celule gigante multinucleate, mijlocie cu celule epitelioidice și periferică dominată de limfocite, macrofage, plasmocite. Extensia infecției pe cale limfatică determină un ansamblu numit «complex primar», caracterizat prin: *șancru de inoculare*, leziunea de la poarta de intrare, *limfangită* și *adenită satelită*.

În aproximativ 85% din cazuri primoinfecția tuberculoasă evoluează inaparent sau subclinic spre *infecție latentă*: un număr variabil de bacili rămân «dorminzi» în leziunile primare cicatrizate și calcificate. *Consecințele primoinfecției tuberculoase inaparente sau subclinice sunt: dezvoltarea imunității antituberculoase (o imunitate relativă) și a sensibilizării tuberculine.*

Complicațiile primoinfecției tuberculoase. Când multiplicarea bacililor la gazda înalt receptivă este mai importantă, centrul leziunilor suferă o necroză solidă de caseificare. Din ganglionii mediastinali bacilii se pot propaga pe cale limfatică retrogradă și infectează pleura. Alteori masa de cazeum se ramolește și leziunile perforează bronhiile (diseminarea infecției în pulmon și eliminarea bacililor prin spută), cavitățile vecine (pleură, pericard) sau vasele sangvine (diseminare sistemică). Bacilii importanți generează nenumărate focare metastatice (tuberculoza miliară sau granulia tuberculoasă, cu evoluție letală). Evacuarea masei de cazeum ramolit creează «caverna» tuberculoasă. Descărcări bacteriemice discrete, e. g. prin depășirea etapei ganglionare a infecției, determină diseminarea bacililor tuberculozei în variate țesuturi (meninge, oase și articulații, rinichi etc.).

Tuberculoza secundară. Reinjecțiile masive sau reactivarea focarelor latente («reinjecție endogenă»), în condițiile scăderii reactivității imune, determină tuberculoza secundară, ale cărei leziuni, spre deosebire de cele primare, nu sunt însoțite de adenită și evoluează cronic fără tendință la vindecare spontană.

Lepra debutează după o incubajie de 2—4 ani și evoluează foarte lent. În raport cu reactivitatea pacienților se cunosc două forme ale leprei: lepra tuberculoidă și lepra lepromatoasă.

■ *Lepra tuberculoidă* sau anesteziacă este forma benignă a bolii, în care leziunile, mai discrete, nu se ulcerează și, ca atare, sunt puțin contagioase.

■ *Lepra lepromatoasă* este forma malignă. Evoluează bacteriemic cu leziuni ulcerate, distructive, contagioase.

Micobacteriozele determinate de speciile condiționat patogene apar la gazde cu deficite ale imunității celulare, mai ales după contaminări masive, și evoluează asemănător tuberculozei cu variate localizări: pulmon (*M. kansasii*, *M. avium*), limfadenite cervicale la copii (*M. scrofulaceum*), leziuni cutanate (*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*).

27.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN TUBERCULOZĂ ȘI MICOBACTERIOZE

27.2.1. Diagnosticul microbiologic

27.2.1.1. Prelevate patologice: recoltare, conservare, preparare

În raport cu forma clinică a tuberculozei se examinează: spută, aspirat sau spălătură bronșică, spălătură gastrică, exsudate aspirate prin puncția cavităților seroase afectate (pleură, meninge, articulații), puroi din abcese reci, probe biopsice, urină, secreție menstruală, materii fecale. Eliminarea bacililor din leziuni poate fi intermitentă, de aceea este indicată examinarea de probe repetate.

Probele care nu sunt examinate imediat, pot fi conservate la +4°C până a doua zi.

Detectarea bacililor tuberculozei este ameliorată dacă se procedează la *concentrarea* lor prin centrifugare timp de 30 minute la 3000—5000 rpm (urină, lichid cefalorahidian) sau prin ultrafiltrare (lichid cefalorahidian). Pentru centrifugare prelevatele vâscoase (ca sputa) sunt în prealabil omogenizate. Metodele de omogenizare realizează și *decontaminarea probelor*. Mai frecvent se recurge la omogenizare și decontaminare prin tratarea probelor cu soluție 4% de NaOH la 37°C, cu agitare repetată timp de 30 minute, urmată de neutralizare cu soluție 10% de HCl. Această tehnică omoară bacteriile neacidorezistente de contaminare care au creștere rapidă și ar invada mediul, făcând imposibilă izolarea micobacteriilor cu creștere lentă sau foarte lentă.

27.2.1.2. Microscopia directă

Uzual bacilosopia se efectuează cu obiectivul 90X IU pe frotiuri colorate Ziehl-Neelsen. Se examinează cel puțin 100 de câmpuri microscopice, liniar de la o extremitate la alta a frotiului. Dacă pe primele 100 de câmpuri nu au fost observați bacili acidorezistenți sau cel mult 1—3, se examinează încă 100—200 câmpuri. Rezultatul poate fi comunicat semicantitativ (tabelul 27.1).

Timpul afectat baciloscopiei se reduce, dacă se examinează inițial frotiul colorat fluorescent cu auramină-rodamină la o mărire de 200X. Confirmarea bacililor fluorescenți depistați se face prin examinarea aceluiași câmpuri cu mărire de 400X. În aceste condiții examenul a 30 de câmpuri microscopice echivalează cu 300 câmpuri examinate cu obiectivul 90X IU pe frotiul colorat Ziehl-Neelsen. Colorația fluorescentă elimină rapid frotiurile negative, cele pozitive urmând a fi confirmate prin examenul cu imersia a aceluiași frotiu recolorat Ziehl-Neelsen.

Tabelul 27.1. Înregistrarea semicantitativă a rezultatelor baciloscopiei

Număr de bacili	Înregistrare
0/100 câmpuri microscopice IU	Absenți bacili acidorezistenți
1—3/100 câmpuri IU	Se consemnează numărul și se solicită o nouă probă
4—9/100 câmpuri IU	Slab pozitiv (+)
10—100/100 câmpuri IU	Moderat pozitiv (++)
100/100 câmpuri IU	Intens pozitiv (+++)
2/ câmp la mărire de 400X în colorație fluorescentă	Intens pozitiv (+++)

Diagnosticul de laborator al leprei se bazează pe depistarea microscopică în exsudatul nazal sau în biopsii din leziuni cutanate a bacililor acidorezistenți necultivabili. În forma lepromatoasă a bolii sensibilitatea baciloscopiei în exsudatul nazal este satisfăcătoare, în forma tuberculoidă microscopia probelor bioptice este indispensabilă.

27.2.1.3. Izolarea și identificarea micobacteriilor

Etapa I. Probele decontaminate le însămânțăm pe panta mediilor solide cum sunt: Löwenstein-Jensen, Popescu, Finn, care, prin compoziția lor complexă, asigură creșterea micobacteriilor și inhibă flora de asociație eventual rămasă după decontaminare. Una din variantele mediului Popescu permite cultivarea formelor L ale bacililor tuberculozei și a micobacteriilor atipice.

Culturile, în tuburi ermetice închise, sunt incubate diferențiat la temperaturi între 22° și 42°C cu urmărirea săptămânală timp de două luni.

Etapa II. Citirea culturilor: Coloniile de *M. tuberculosis* apar după 2—3 săptămâni de incubare la 37°C, sunt ruгоase, mamelonate, alb-bej și cresc progresiv în volum (creștere eugonică) până iau aspect conopidiform. Sunt greu emulsionabile. *M. bovis* crește mai lent (după 4 săptămâni) și formează colonii mici (creștere disgonică) albe, S, ușor emulsionabile. *M. africanum* formează colonii R disgonice.

Micobacteriile atipice au aspecte de cultură variate în funcție de specie: temperatura optimă de incubare, viteza creșterii, aspectul coloniilor, pigmentogeneza.

Etapa III. Identificarea speciilor de micobacterii izolate se bazează pe mai multe caractere (tabelul 27.2):

a) Aspectul coloniilor și pigmentogeneza.

b) Temperatura de incubare și viteza creșterii.

c) Activitatea biochimică:

■ testul catalazei: bacili tuberculozei produc o catalază termosensibilă (inactivată în 30 de minute la 68°C), micobacteriile atipice produc o catalază termorezistentă;

■ sinteza de niacină (pozitivă la *M. tuberculosis*);

■ testele ureazei, arilsulfatazei etc.

d) Patogenitatea experimentală pentru diferite gazde: cobai, iepure, șoarece, păsări.

e) Spectrul de sensibilitate la antibiotice și chimioterapice antituberculoase.

Antibiograma o facem printr-o variantă a metodei diluțiilor (metoda proporțiilor), însămânțând o suspensie bacilară standardizată pe mediile Popescu sau Löwenstein-Jensen cu diluții de tuberculostatice și un tub martor fără tuberculostatic.

Tabelul 27.2. Caractere diferențiale între bacilii tuberculozei și unele micobacterii

Specii	Rata creșterii la:					Niacină
	20°	25°	33°	42°	45°	
Cu creștere lentă ⁴						
Necromogene:						
<i>M. tuberculosis</i>	—	—	+	—	—	+
<i>M. africanum</i>	—	—	+	—	—	+
<i>M. bovis</i>	—	—	+	—	—	—
<i>M. avium</i>	V	+	+	+	V	—
<i>M. gastri</i>	—	+	+	—	—	—
<i>M. ulcerans</i>	—	—	+	—	—	±
Scotocromogene ⁵						
<i>M. scrofulaceum</i>	V	+	+	+	—	—
Fotocromogene ⁶						
<i>M. kansasii</i>	—	+	+	V	—	—
<i>M. marinum</i>	+	+	+	—	—	—
Cu creștere rapidă ⁷ :						
<i>M. chelonae</i>	+	+	+	—	—	
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	V	—	
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	+	+	
<i>M. phley</i>	+	+	+	+	+	

Simboluri: ++ — 85% din tulpini pozitive; ←→ — 85% din tulpini negative; ±± — 51—84% din tulpini ne semnificative.

¹ Cca 3 zile pentru speciile cu creștere rapidă și 10 zile pentru cele cu creștere lentă.

² Cca 3 zile pentru speciile cu creștere rapidă și cca 9 zile pentru cele cu creștere lentă.

³ TZ — tiacetazonă 10 μg/ml; TCH — hidrazida acidului tiufen-2-carboxilic 1 μg/ml; E — etambutol

⁴ Creștere lentă — 2 sau mai multe săptămâni.

⁵ Scotocromogene — pigment galben-portocaliu, apare spontan la întuneric.

⁶ Fotocromogene — pigment portocaliu, apare numai după expunere la lumină.

⁷ Creștere rapidă — în 3—7 zile.

Antibiograma se impune repetată pentru tulpinile eventual izolate pe parcursul bolii, pentru a corecta tratamentul cu chimioterapice active.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză, precizând: specia sau grupul micobacteriei izolate și rezultatul antibiografei.

Pentru izolarea și identificarea mai rapidă a bacililor tuberculozei putem recurge la cultivarea probelor decontaminate pe medii speciale prin tehnica Pryce (mediu cu sânge defibrinat) și Șkolnikov (mediu cu sânge hemolizat), care permit evidențierea cordfactorului prin dispunerea bacililor în frotiul din microcolonii sub aspectul de corzi (cosițe). Rezultatul trebuie confirmat prin izolarea și identificarea clasică.

Izolarea bacililor tuberculozei prin inocularea cobailor este mai sensibilă decât izolarea pe medii de cultură. Această metodă se aplică în cazuri de afecțiuni pulmonare dubioase și, mai frecvent, în forme de tuberculoză extrapulmonară. La 2 cobai, aleși cu i. d. r. la tuberculină negativă, se injectează subcutanat, pe fața internă a coapsei drepte, 1—2 ml prelevat patologic decontaminat. Se supraveghează 2—3 luni animalele injectate, urmărind:

- greutatea și aspectul general;

oportuniste ori saprofitate întâlnite în prelevate patologice

Nitrat reductază	Ariisulfatază ¹	Tween hidroliză	Catalază, 68°C	Urează	Telurit, reducere ²	Rezistența la ³			
						TZ	TCH	E	HIN
+	-	±	-	+	-/+	-	+	-	-
+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
-	+	-	-	+	-/+	-	+	+	-
-	-	-	±	-	+/+	+	+	+	+
-	+	+	-	+	-/-	-	+	-	-
-	-	-	+	-	-/-	+	+	±	-
-	-	-	+	+	-/+	+	+	+	±
-	+	+	+	+	-/-	-	+	+	-
-	+	+	+	+	-	±	+	±	±
-	+								
+	+								
+	-								
+	-								

pozitive; + - 16-50% din tulpini pozitive; V - variabilitate de tulpină; spații necompletate - teste

5 μg/ml; HIN - hidrazida acidului izonicotinic 10 μg/ml.

■ apariția în cca 2 săptămâni la locul inoculării a unui nodul, indurat, cazeos, însoțit de adenită satelită, care eventual se fistulizează;

■ pozitivarea i. d. r. la tuberculină după 3-4 săptămâni de la injectarea prelevatului.

La necropsia animalelor sacrificate sau moarte se constată complexul primar la locul de injectare și noduli tuberculoși caracteristici diseminați în splină, ficat și pulmonii. În leziuni depistăm microscopic bacili acido-rezistenți, care pot fi reizolați în culturi pure pentru identificare.

Avantajul injectării la cobai constă nu numai în sensibilitatea metodei de izolare, ci și în depistarea variantelor de bacili cu vitalitate redusă, care nu cresc pe medii de cultură.

27.2.2. Diagnosticul imunologic

Un rezultat negativ al culturilor nu exclude tuberculoza. Pot fi leziuni închise, uneori inabordabile puncției pentru prelevări. În aceste cazuri se recurge la depistarea sensibilizării specifice prin i. d. r. cu tuberculină/PPD.

Pe fața anterioară a antebrațului, în 1/3 mijlocie, se injectează strict intradermic 2 UT/0,1 ml. După 24—72 ore se înregistrează diametrul în mm a papulei infiltrative de la locul inoculării. *Reacția negativă*: papulă cu diametrul sub 9 mm. *Reacție pozitivă*: papulă cu diametrul de cel puțin 10 mm. Persoanele cu i. d. r. negativă la 2 UT sunt retestate în interval de maximum 15 zile cu 10 UT/0,1 ml.

Reacția negativă exclude infecția tuberculoasă, dacă pacientul nu este sub terapie imunosupresivă sau în anergie fiziologică (sarcină) ori patologică (convalescența gripei, a rujeolei, SIDA), ori sub tratament imunodepresiv sau supresiv.

Reacția pozitivă trebuie interpretată după intensitate și în contextul clinico-epidemiologic. *Tuberculoza sau evoluția nefavorabilă a primoinfecției sunt posibile în următoarele trei situații*:

- reacție pozitivă foarte intensă la 2 UT;
- virajul reacției de la negativ la pozitiv la copii nevaccinați BCG;
- «saltul tuberculinic»: creșterea diametrului reacției cu peste 8 mm între 2 testări.

Pentru surprinderea virajului sau a «saltului tuberculinic» sunt necesare testări în dinamică la intervale de 6 luni, care se pot realiza numai țintit în focare de tuberculoză (retestări la intervale mai scurte duc la desensibilizări cu denaturarea rezultatelor).

Diagnosticul infecțiilor cu micobacterii atipice se bazează pe: microscopie (cu valoare numai orientativă), izolarea și identificarea speciilor (vezi tabelul 27.1). Micobacteriile atipice izolate capătă semnificație clinică în absența bacililor tuberculozei, când izolarea lor repetată coincide cu evoluția bolii sau când sunt izolate din prelevate necontaminate.

27.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul tuberculozei

- Tuberculina PPD pentru i. d. r.
- Vaccinul viu atenuat BCG.
- Tuberculostatice: rifampicină, hidrazida acidului izonicotinic (HIN), etambutol, pirazinamidă etc.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI

Sifilisul (luesul) este o treponematoză veneriană umană caracterizată prin evoluție stadială.

28.1. DATE GENERALE

28.1.1. O minidefiniție

Treponemele sunt spirocheți relativ fini. Mobilitatea le este asigurată prin mai multe fibrile axiale periplasmice, inrulate în jurul protoplastului și inserate la extremitățile cilindrului protoplasmic prin corpi bazali conectați cu fibrile citoplasmice (microtubuli sau endoflageli). Strict anaerobi sau microaerofili sunt foarte pretențioși nutritiv. Speciile patogene nici nu pot fi cultivate pe medii artificiale.

28.1.2. Repere taxonomice și habitat

Dificultatea sau chiar imposibilitatea de a cultiva treponemele *in vitro* face dificil studiul lor pentru o clasificare satisfăcătoare. Ele constituie genul *Treponema* al familiei *Spirochaetaceae*. Interes medical prezintă:

- *Treponema pallidum*, cu trei biotipuri diferențiate numai prin caracterele clinico-epidemiologice ale bolilor determinate: biotipul *pallidum*, cauză a sifilisului, biotipul *endemicum*, cauză a sifilisului endemic (bejel), cu transmitere nonveneriană, și biotipul *pertenue*, cauză a pianului, altă treponematoză nonveneriană cu poartă de intrare cutanată.

- *T. carateum*, cauză a unei treponematoze nonveneriene numite pintă sau carate și răspândită în zona tropicală a Americii și în Oceania.

- *T. paraluisuniculi* cauzează sifilisul iepurilor. Are interes medical pentru tulpina Nichols de *T. pallidum*, sursa de antigen specific în serodiagnosticul sifilisului, se întreține în laborator pe iepuri infectați prin injecție intratesticulară. Pentru a evita confuzii, acești iepuri trebuie să fie indemni de infecția cu *T. paraluisuniculi*.

- Treponeme orale: *T. denticola* și alte specii mai puțin bine definite (*T. vincentii*, *T. scoliodontum*, *T. orale*, *T. macrodentium*), revezi partea a doua, tabelul 22.1.

- Treponeme genitale: *T. phagedenis*, *T. refringens*, *T. minutum*.

28.1.3 Factori de patogenitate

La *T. pallidum* pot fi considerați factori de patogenitate următoarele capacități:

■ de aderență la receptori celulari (fibronectină) și ai matricei intercelulare (laminină și colagen);

■ de eludare temporară a răspunsului imun prin mascare cu molecule plasmatică (imunoglobuline, complement) sau molecule de clasa I ale complexului HLA fixate pe membrana externă;

■ depresia temporară, în primele stadii ale infecției, a răspunsului imun celular;

■ răspuns autoimun al gazdei la cardiolipină (antigen comun treponemelor și țesuturilor animale — vezi mai jos), la fibronectină, laminină și colagen.

28.1.4. Receptivitatea la treponematoze

Receptivitatea la infecția cu biotipurile de *T. pallidum* este generală. Pinta afectează cu precădere rasele cu pielea de culoare închisă.

28.1.5. Principalele treponematoze

Sifilisul se transmite sexual în peste 90% din cazuri. În rest contagiul se face transplacental (sifilisul congenital), prin obiecte foarte recent contaminate de bolnavul contagios (cca 0,01% din cazuri), transfuzie de sânge, sărut; prin neglijarea măsurilor de autoprotecție de către medici în cursul intervențiilor chirurgicale, a consultațiilor urogenitale, de către personalul de laborator la prelucrarea prelevatelor patologice.

După o incubatie de 2—6 săptămâni, boala evoluează în 3 stadii:

Sifilisul primar evoluează 4—8 săptămâni. La poarta de intrare (eroziuni tegumentare, mucoasa genitală, bucală) apare șancrul sifilitic, o ulceratie bine circumscrisă, colorată roșu-jambonat, situată pe o bază infiltrativă, indurată (șancru tare), care, după cca o săptămână, se însoțește cu adenită satelită. *Leziunile sifilisului primar sunt superficiale, bogate în treponeme (contagioase) și se vindecă spontan fără cicatrice.* La sfârșitul stadiului primar reacțiile serologice se pozitivează.

Sifilisul secundar apare după 6—8 săptămâni de evoluție a șancrului tare și reprezintă faza de *generalizare bacteriemică* a infecției cu numeroase și variate leziuni metastatice: cutanate (exantem cu sifilide maculare, papulare, papuloerozive, papulocrustoase), ale mucoaselor (enantem cu sifilide eritematoase sau erozive), poliadenite, periostite, artrite, corioretinită, meningită sifilitică, nefrită. *Leziunile sifilisului secundar, generalizate, bogate în treponeme (cel mai contagios stadiu al bolii), se vindecă spontan fără cicatrice.* În lipsa tratamentului etiologic, pot fi recidivante cu manifestări predominant pe tegument și mucoase.

Răspunsul imun umoral este maximum, dar cel celular apare abia la sfârșitul stadiului secundar. După apariția răspunsului imun celular cca 25% din bolnavi se vindecă microbiologic, la alți cca 25% infecția evoluează latent până la sfârșitul vieții.

Sifilisul terțiar. Numai la cca 50% din pacienții netratați infecția se reactivează mai precoce (2—3 ani) sau mai tardiv (10—20 ani). *Treponemele* persistente în focare tisulare profunde, deși au o multiplicare limitată, produc leziuni granulomatoase distructive și localizate: gome osoase și cutanate, scleroze viscerale caracteristice sifilisului cardiovascular (anevrism și insuficiență aortică), nervos (tabesul, paralizia generală progresivă) etc.

Existența răspunsului imun celular specific în stadiul terțiar al bolii este dovedită prin pozitivarea i. d. r. cu luetină (un antigen specific al *T. pallidum*) la 100% din pacienți.

Reacțiile serologice prezintă oscilații (remisiuni și ascensiuni ale titrului de anticorpi) legate de eliberarea antigenilor din leziuni.

Sifilisul congenital determină moartea fătului, cu avort, sau un nou-născut cu leziuni sifilitice (cheratită interstijială, leziuni dentare, ale oaselor nazale, ale sistemului nervos central).

Bejelul, determinat de *T. pallidum* biotipul *endemicum*, adaptat la transmitere extragenitală, afectează cu precădere copii din zonele tropicale. Evoluează stadial cu leziuni cutanate diseminate, foarte contagioase. Leziunile viscerale sunt rare.

Pianul, determinat de *T. pallidum* biotipul *pertenue*, evoluează endemic în zone tropicale umede, subdezvoltate. Șancrul este extragenital (buză, antebraț, gambă), erupția stadiului secundar este papulo-uceroasă, exclusiv cutanată, iar în stadiul terțiar apar numai gome.

28.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A SIFILISULUI

28.2.1. Diagnosticul microbiologic

Posibilitățile diagnosticului direct al sifilisului se limitează numai la microscopie.

28.2.1.1. Prelevate patologice

■ Serozitatea exprimată prin comprimarea bazei șancrului, după decontaminarea îngrijită a leziunii prin spălare cu soluție salină izotonă, aspirată prin capilaritate în pipetă Pasteur.

■ Aspiratul prin puncția ganglionilor limfatici regionali afectați.

■ Exsudatul din elementele eruptive cutanate sau mucoase ale sifilisului secundar.

28.2.1.2. Microscopia directă

În sifilisul primar microscopia directă este unica posibilitate de diagnostic.

■ *Preparatul nativ între lamă și lamelă* examinat la microscopul cu fond întunecat. Pe câmpul negru se urmăresc treponemele strălucitoare, subțiri de 0,1—0,18 μm, cu capetele efilate, cu 6—14 spire adânci regulate și cu mișcări caracteristice (rotație, flexie, translație). Treponemele genitale comensale sunt mai groase, dar diferențierea lor este dificilă și cere experiență.

■ *Preparate colorate Giemsa*. Frotiul se fixează 10—15 minute cu alcool metilic, apoi se colorează 30 minute cu soluție Giemsa. La microscopul cu imersie se observă treponemele colorate ușor în roz-roșu.

■ *Preparate colorate prin impregnarea argentică Fontana-Tribondeau*:

— se tratează de 3 ori, câte 20—30 secunde, frotiul nefixat, cu soluție Rugge (formol 2 ml, acid acetic 1 ml, apă distilată 100 ml);

— se spală;

— se acoperă frotiul cu acid tanic soluție 5% și se încălzește 1—3 minute (fără emiterie de vapori);

— se spală cu apă distilată;

— se acoperă frotiul cu azotat de argint amoniacal soluție 5% și se încălzește un minut ca mai sus;

— se spală frotiul cu apă distilată, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie.

Pe fondul galben al frotiului, treponemele apar colorate în negru-brun.

■ *Colorația imunofluorescentă directă* este puțin accesibilă, dar evită riscul confun-
dării *T.pallidum* cu treponemele genitale comensale. Se tratează frotiurile cu conjugat
fluorescent al anticorpilor specifici anti-*T.pallidum*. La microscopul luminescent numai
treponemele sifilisului apar fluorescente, cu morfologie tipică.

28.2.2. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este posibil la sfârșitul stadiului primar al sifilisului, pe tot
parcursul bolii, precum și la persoanele cu infecție latentă.

Se examinează probe de ser și, în raport cu simptomatologia, probe de lichid
cefalorahidian.

Cum *T.pallidum* nu poate fi cultivată *in vitro*, pentru reacțiile serologice sunt folosite
următoarele categorii de antigeni:

■ *Cardiolipina*, o haptenă lipidică prezentă în *T.pallidum* și în țesuturile animale. Se
obține ca extras din cordul de bou îmbogățit cu colesterol și lecitină.

■ *Antigen proteic de grup*, comun treponemelor patogene și unor treponeme comensale
cultivabile. Se obține din cultura tulpinii Reiter de *T.phagedenis*.

■ *Antigenii proteici și polizaharidici specifici biotipurilor de T.pallidum*. Se utilizează
fie suspensii, fie extracte ale tulpinii Nichols de *T.pallidum* multiplicată prin injectare
intratesticulară la iepuri.

Primii care pot fi depistați în evoluția bolii sunt anticorpii antitreponemici specifici
(anticorpii imobilizanti la 10—15 zile după apariția șancrului), urmează apoi anticorpii
antiproteici de grup și în final anticorpii antilipoidici (14—25 zile de la apariția șancrului).
Primii care dispar după vindecarea microbiologică a sifilisului sunt anticorpii antilipoidici:
după 6—24 luni, în raport cu precocitatea tratamentului. Anticorpii antiproteici de grup
și, mai ales, cei specifici sunt mult mai persistenți.

Reacții serologice cu cardiolipină, RFC și testul de floculare VDRL, depistează în
serul bolnavilor anticorpii antilipoidici. Sunt cele mai accesibile și curent folosite în diag-
nosticul, depistarea activă a sifilisului și controlul eficienței terapiei antisifilitice, pentru
că antigenul cardiolipină este relativ ieftin. Rezultatele sunt orientative. Reacții fals pozitive
pasagere apar în cursul sarcinii, bolii serului, unor infecții acute bacteriene (scarlatină,
pneumonii pneumococice sau cu micoplasmă, tifos exantematic, chlamidioze), virale
(hepatite, gripă, varicelă, rujeolă, mononucleoză infecțioasă) sau cu protozoare (malaria
etc.). Reacții fals pozitive persistente întâlnim în infecții cronice (tuberculoză, lepră), boli
autoimune (colagenoze, anemie hemolitică, tiroidită Hashimoto etc.), uneori la vârstnici.
Reacții fals negative pot să apară în sifilisul latent sau în cel terțiar.

Reținem:

■ La pacienți cu semne clinice sugestive, prezența anticorpilor antilipoidici confirmă
diagnosticul de sifilis, dar absența lor nu îl poate infirma.

■ În absența semnelor clinice sugestive, reacțiile pozitive cu antigenul cardiolipină
trebuie confirmate prin testări cu antigeni treponemici specifici.

■ Scăderea constantă a titrului anticorpilor serici antilipoidici sau dispariția lor în
lichidul cefalorahidian denotă vindecarea sifilisului.

Reacțiile cu antigeni treponemici (reacția de fixare a complementului — RFC, reacția
de hemaglutinare indirectă — RHAI, reacția de imunofluorescență indirectă — RIFI,
reacția de imobilizare a treponemelor — RIT, ELISA, reacția de imunoaderență etc.)
permit obținerea rezultatelor serologice confirmative, decisive pentru diagnosticul
sifilisului.

Astfel:

- In campaniile de depistare activă a bolii se utilizează pentru fiecare ser două teste de rutină: RFC cu cardiolipină sau antigen proteic de grup și reacția de floclurare VDRL;
- pentru confirmarea diagnosticului, se completează testele de rutină printr-un test cu antigen treponemic specific.

1. *Testul de floclurare VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)* poate fi efectuat in tuburi sau pe plăci din polistiren cu godeuri.

Se amestecă antigenul cardiolipinic VDRL, diluat in soluție izotonă tamponată, cu serul de cercetat încălzit 30 minute la 56°C și centrifugat pentru clarificare. Se omogenizează timp de 4 minute prin mișcare uniformă, circulară, cu 160—180 rpm. Se citește sub lupă (80X—100X). *Reacție pozitivă:* flocoane mari in lichidul limpede. *Reacție negativă:* lichidul rămâne cu turbiditatea omogenă.

2. *Reacția de fixare a complementului* (revedi partea întâi, 10.2.2.3.). Se utilizează fixarea rapidă (45 minute) la 37°C, tehnica Wassermann, sau fixarea prelungită (18—20 ore) la 4°C, tehnica Kolmer. Fixarea prelungită la rece este mai sensibilă, dar mai puțin specifică. Se efectuează reacția cu serul inactivat al bolnavului, cardiolipină și antigeni treponemici de grup sau, pentru confirmarea diagnosticului, specifici.

3. *Reacția de hemaglutinare indirectă.* Se folosesc hematii de berbec tanate sau formolate și sensibilizate cu antigen treponemic proteic specific. Înainte de reacție se absorb serurile de testat cu sorbent preparat din tulpina Reiter de *T. phagedenis* pentru îndepărtarea anticorpilor antilipidici și antiproteici de grup. RHA1 este sensibilă, specifică și accesibilă oricărui laborator ca metodă calitativă sau cantitativă in plăci cu godeuri.

4. *Reacția de imunofluorescență indirectă.* Frotiuri din suspensia tulpinii Nichols de *T. pallidum* se tratează cu serul suspect absorbit (vezi mai sus). După spălare, se tratează frotiurile cu conjugat fluorescent antiimunoglobulină umană. Fixarea anticorpilor pe *T. pallidum* duce la atașarea și a antiimunoglobulinei umane marcate, care vizualizează treponemele in galben-verzui când se examinează frotiurile la microscopul cu fluorescență.

5. *Reacția de imobilizare a treponemelor.* Se amestecă suspensia tulpinii Nichols de *T. pallidum* în mediul Nelson-Mayer cu serul suspect inactivat și complement. Se incubează amestecul 18 ore la 37°C in anaerostat. Ulterior din fiecare amestec se efectuează preparate între lamă și lamelă, care sunt examinate la microscopul cu fond întunecat, și este stabilită proporția treponemelor imobile din totalul treponemelor observate. Treponemele imobilizate in proporția de 51—100% indică un rezultat pozitiv, 25—50% unul slab pozitiv și < 20% unul negativ.

Diagnosticul infecțiilor determinate de celelalte biotipuri de *T. pallidum* se bazează pe examenul clinic, depistarea microscopică a treponemelor in leziuni și aceleași teste ca și pentru serodiagnosticul sifilisului.

28.2.3. Biopreparate utilizate in diagnosticul de laborator al sifilisului

- Imunoconjugat fluorescent anti-*T. pallidum* pentru RIF directă.
- Antigen cardiolipină pentru reacția de floclurare VDRL, RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic proteic de grup pentru RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic specific pentru RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic specific adsorbit pe hematii pentru RHA1.
- Imunoconjugate anti-imunoglobulină umană pentru RIFI.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BORRELIOZELOR

29.1. DATE GENERALE

29.1.1. O minidefiniție

Borreliaele sunt spirocheți cu 3—10 spire laxe, mai groase decât treponemele, cu mobilitate asigurată prin mai multe (7—30) fibre axiale periplasmice și transmise la vertebrate prin artropode hematofage.

29.1.2. Repere taxonomice

Clasificarea borreliilor, ca și a treponemelor, este dificilă din cauza greutății de cultivare. Sunt reunite în genul *Borrelia* din familia *Spirochaetaceae*. Specii cu interes medical sunt:

- *Borrelia recurrentis*, agentul etiologic al febrei recurente epidemice.

- Borreliile care cauzează febra recurentă endemică aparțin mai multor specii, numite fie în raport cu artropodul vector, fie cu regiunea geografică în care constituie focare naturale ale bolii. Speciile cunoscute în Eurasia (Peninsula Iberică, Asia, Caucaz, Ucraina, Cipru) și Africa sunt: *B.hispanica*, *B.duttonii*, *B.persica*, *B.caucasica*, *B.latschewii* etc. În America sunt cunoscute: *B.parkeri*, *B.hermsii* etc.

- *B.burgdorferi*, agentul etiologic al bolii Lyme.

29.1.3. Habitat

B.recurrentis, cu răspândire cosmopolită, este găzduită de om și transmisă prin *Pediculus humanus*.

Borreliile febrilor recurente endemice circulă în focarele naturale din diverse zone ale lumii în care se reunesc speciile de rozătoare gazdă cu căpușele vector (specii de *Ornithodoros*).

B.burgdorferi, cu răspândire cosmopolită, are ca rezervor de infecție variate mamifere (rozătoare, carnivore, cervide) și păsări. Vectorii principali sunt căpușe din genul *Ixodes* și *Amblyomma* (variate în raport cu zona geografică), iar vectorii secundari țânțari, tăuni ș. a. Animalele domestice (câini, pisici) pot fi gazdă de menținere pentru căpușe și spirocheți și pot aduce căpușele infectate în colectivități umane.

29.1.4. Factori de patogenitate

Factorii de virulență ai borreliilor sunt insuficient cunoscuți. Putem însă reține:

■ *Capacitatea invazivă.* Difuzează în țesutul cutanat de la poarta de intrare (înțepătura artropodului hematofag, leziunile de grataj contaminate cu lichidul celomic sau, în funcție de specie, cu fecalele acestuia) și, antrenate de curentul limfatic și sangvin, în cele mai variate organe și țesuturi.

■ *Capacitatea de a se localiza și supraviețui în situsuri «privilegiate»,* endotelii, fibroblaste, macrofage, la adăpost de răspunsul imun.

■ *Variația antigenică* a borreliilor febrei recurente explică evoluția recurentă a bolii și valoarea redusă a testelor serologice de diagnostic. Apare cu o rată de 10^{-3} — 10^{-4} /celulă/generație și se datorează recombinării genelor plasmidice care codifică proteina majoră variabilă a acestor borrelii.

■ *Epitopii comuni ai B.burgdorferi* cu proteine ale organismului și alterarea structurilor «self» în evoluția îndelungată a reacțiilor inflamatorii din boala Lyme poate explica manifestările autoimune din această boală.

■ Prezența unei lipopolizaharide cu caractere de endotoxină.

29.1.5. Receptivitatea la borrelioze

Receptivitatea la borrelioze este generală. De reținut este că în infecția cu *B.burgdorferi* pacienții care poartă antigenul HLA-DR₂ pe limfocitele B fac mai frecvent leziuni neurologice și articulare (vezi mai jos).

29.1.6. Boreliozele

Febrele recurente apar după o incubajie de 3—14 zile și se caracterizează prin accese febrile (39°—40°C) întrerupte prin perioade afebrile de 6—7 zile. Primul acces febril durează 3—7 zile și este urmat de 3—4 accese mai scurte (de numai 2—4 zile), dar la pacienții debilitați numărul acceselor poate fi și peste 10. Bolnavii au leziuni organice grave și prezintă hepatosplenomegalie. Frecvent au sindrom hemoragic, meningeal (reacție meningeală până la meningită), alterarea funcției renale, leucocitoză, stare toxică.

În timpul incubajiei și al perioadelor afebrile borreliile se multiplică în viscere. Accesele febrile sunt declanșate de borreliile care invadează în număr mare curentul sangvin (10^{5-7} borrelii/ml sânge). La sfârșitul fiecărui episod febril anticorpii borrelizici selectează varianta antigenică responsabilă de următorul acces.

Febra recurentă epidemică evoluează grav cu mortalitate până la 30%, cea endemică este mai puțin gravă.

Boala Lyme (Lyme, localitate în Connecticut — S.U.A.) apare după o incubajie de 2—4 săptămâni de la înțepătura infectantă și evoluează în 3 stadii:

■ *Stadiul primar.* Principala leziune este eritemul migrator cronic, apărut în jurul înțepăturii artropodului infectant, care evoluează în medie 3—4 săptămâni pe un fond febril, de astenie, mialgii și artralgii migratoare, limfadenită regională sau generalizată. Frecvent apar elemente eruptive inelare eritematoase sau urticarie generalizată. Se mai pot asocia hepatosplenomegalie și tumefieri testiculare.

■ *Stadiul secundar* durează 2—6 săptămâni și evoluează cu artralgii, manifestări neurologice (meningoradiculite), cardiace (pericardică, bloc atrioventricular), vasculare (vasculite, purpură trombocitopenică).

■ *Stadiul terțiar* durează de la câteva luni până la 2 ani de manifestări cronice sau recidivante predominant articulare: artrite (mai frecvent ale articulațiilor mari — genunchi, cot).

29.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN FEBRELE RECURENTE

Diagnosticul etiologic al febrei recurente, epidemică sau endemică, se stabilește relativ ușor prin microscopia probelor de sânge prelevate în accesele febrile. Se examinează preparate native între lamă și lamelă la microscopul cu fond negru și frotiuri colorate Giemsa la microscopul cu imersie.

Izolarea borreliilor, pe medii artificiale sau prin inoculare la animale de laborator, nu este uzuală.

În tratamentul febrei recurente sunt indicate antibiotice din grupul penicilinelor și tetraciclinelor.

29.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A BOLII LYME

Pentru diagnosticul microbiologic se examinează biopsii cutanate, sânge, lichid cefalorahidian, aspirat din ganglionii limfatici afectați; rar este capturată și căpușa suspectă. Microscopia directă este cel mai frecvent negativă. Se mai izolează *B. burgdorferi* pe mediul special Kelly cu incubare de 2 săptămâni la 30°C în condiții microaerofile, urmată de identificarea culturii.

Diagnosticul serologic. Se urmărește în serul pacienților anticorpul anti-*B. burgdorferi*, IgM în stadiul primar și IgG în stadiile tardive, prin imunofluorescență indirectă sau ELISA. Testele serologice sunt mai sensibile în stadiile 2 și 3 ale bolii. Reacții fals pozitive sunt posibile. De aceea rezultatele trebuie interpretate atent, numai în context clinic.

Profilaxie specifică nu există încă. Tratamentul se face cu doze mari de peniciline, tetraciline sau eritromicină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR

30.1. DATE GENERALE

30.1.1. O minidefiniție

Leptospirele sunt spirocheți cu 10—30 spire regulate, strânse, puțin adânci și cu unul sau ambele capete încârligate. Mobilitatea le este asigurată printr-un axistil format din 2 flageli periplasmici, în jurul cărora se înrulează cilindrul protoplasmic.

30.1.2. Repere taxonomice

Leptospirele sunt reunite în familia *Leptospiraceae* cu două genuri: *Leptospira* și *Leptonema*, dintre care numai primul prezintă interes medical.

Genul *Leptospira* cuprinde 3 specii: una patogenă, *L. interrogans*, și două nepatogene, *L. biflexa* și *L. parva*.

L. interrogans are 22 serogrupe cu peste 200 serovaruri. Recent, prin anticorpi monoclonali, a fost demonstrat că antigenul specific de serovar este parte integrantă a lipopolizaharidei leptospirelor, iar antigenul specific de gen este proteic.

30.1.3. Habitat

L. interrogans este găzduită de mamifere:

■ *Gazdele de menținere*, în stare de sănătate aparentă, poartă leptospirele în rinichi și, posibil, în organele de reproducere. Există o afinitate a serogrupelor pentru o anumită gazdă de menținere: e.g. *icterohaemorrhagiae* pentru șobolanul brun, *canicola* pentru câini, *pomona* pentru porci, *tarassovi* pentru porcine și bovine, *grippotyphosa* și *hebdomadis* pentru șoareci etc. La aceste gazde doza infectantă este foarte mică și infecția se transmite larg intraspecific prin urină sau pe cale sexuală. Cele mai numeroase gazde de menținere sunt rozătoarele.

■ *Gazdele accidentale* contractează infecția, cu variate serovaruri, uzual prin elemente de mediu contaminate cu urina gazdelor de menținere sau a altor gazde accidentale. Doza infectantă este mare, frecvent infecția este manifestă clinic, iar portajul renal de durată relativ mai scurtă. Omul sau animale domestice pot fi gazde accidentale.

■ *Gazdele de amplificare* sunt gazde accidentale între care infecția se poate transmite epidemic. Așa sunt animalele domestice din crescătorii (vite, porci, câini), care transmit infecția și către gazdele de menținere sau om.

În apă și solul umed, în nămol *L.interrogans* persistă timp îndelungat (până la 42 zile). *L.biflexa* trăiește în apele de suprafață, iar *L.parva* în apa de conductă.

30.1.4. Factori de patogenitate

Virulența leptospirelor rezultă din:

- capacitatea invazivă asigurată prin mobilitatea lor mare și, probabil, producerea de hialuronidază,
- capacitatea adezivă la glicocalixul celulelor gazdei,
- capacitatea de multiplicare *in vivo*,
- acumularea de endotoxină.

30.1.5. Receptivitatea la leptospiroze

Nu numai virulența tulpinii, ci și rezistența gazdei are, în particular răspunsul imun, un rol important în severitatea manifestărilor leptospirozelor. Este bine cunoscută sensibilitatea mare a cobailor tineri la infecția experimentală cu variate serogrupe și serovaruri de *L.interrogans* și rezistența iepurilor, șobolanilor, șoarecilor.

30.1.6. Leptospirozele

Omul contractează leptospiroza prin tegumente și mucoasa conjunctivală, nazală sau bucală la contactul cu apa, nămolul, solul umed ori alimentele contaminate cu urina animalelor infectate. Sunt repede antrenate în circulația generală, fără a determina leziuni la poarta de intrare, pătrunzând în lichidul cefalorahidian și în toate țesuturile. După o incubajie de 3—14 zile, boala debutează cu o fază septicemică, febrilă, care durează cca 7 zile. Urmează o perioadă afebrilă de 1—3 zile, după care începe faza organică a bolii, manifestată prin febră și o simptomatologie variată în funcție de organele predominant afectate.

În faza organică leptospiroza poate evolua anicteric (simplă febră, sindrom meningeal, nevrite, mielite, encefalite, sindrom renal) sau icteric (sindromul Weil). Această evoluție nu ține atât de serovarul infectat, cât de virulența tulpinii și reactivitatea gazdei. Endotoxemia este responsabilă de gravul sindrom cardiovascular hemoragic cu letalitate de 6—8%. Manifestările hemoragice sunt mai frecvente în leptospirozele icterice.

Leptospirele se pot localiza în uterul gravid și trec transplacentar determinând avort.

Cele mai grave îmbolnăviri le cauzează leptospirele din grupele *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *bataviae* ș. a.; forme benigne, cele din grupul *grippotyphosa*.

30.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN LEPTOSPIROZE

30.2.1. Diagnosticul microbiologic

30.2.1.1. Prelevate patologice

În prima săptămână de boală se urmăresc leptospirele în sânge, iar din a doua săptămână în urină și, la pacienți cu meningită, în lichidul cefalorahidian. Cum leptospirele

sunt foarte sensibile la pH acid, se prelevă probe de urină alcalinizată prin administrare prealabilă pacientului de citrat de potasiu sau bicarbonat de sodiu. Necroptic se prelevă probe de țesut renal și hepatic. În scopuri epidemiologice se examinează și urină sau țesut renal de la animale, probe de apă, nămol.

30.2.1.2. Microscopia

Se examinează preparate native și preparate colorate.

Examenul preparatului umed între lamă și lamelă a sedimentului de urină sau lichid cefalorahidian la microscopul cu fond negru depistează leptospirele strălucitoare, cu morfologie caracteristică și cu mișcări de rotație, flexie și translație. Microscopia plasmei sangvine în preparat nativ poate da erori, din cauza confuziei expansiunilor fibrilare ale trombocitelor și hematiilor cu leptospire.

Efectuăm frotiuri de sânge, din sedimentul umorilor prelevate sau amprente de organe. Pe preparatele microscopice colorate Giemsa leptospirele apar colorate în roșu-violet, iar după impregnare argentică Fontana-Tribondeu în negru-brun.

Mai puțin accesibilă este colorația imunofluorescentă directă.

30.2.1.3. Izolarea și identificarea

Leptospirele pot fi izolate pe medii artificiale sau prin inoculare la animale receptive.

Multe tulpini de leptospire cultivă ușor pe mediile clasice, care sunt, în principiu, soluții saline, mai mult sau mai puțin complexe, tamponate la pH 7,2 și suplimentate cu 10% ser de iepure inactivat (e.g. mediile Korthof, Stuart). Unele tulpini sunt mai pretențioase, dar pot fi izolate pe medii semisintetice cu serum-albumină bovină și acizi grași (e.g. mediul EMJH — Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris). Cultura apare după 10—30 zile de incubare aerobă la 28°C fără a modifica semnificativ turbiditatea mediului. Apariția culturii o urmărim la intervale de 5 zile prin microscopie pe fond negru.

Umorile și țesuturile pot conține inhibitori pentru leptospire. De aceea însămânțăm probele ca atare și în diluții. Exemple:

Hemocultura. Se însămânțează 0,5 ml într-un prim tub cu 10 ml mediu și se omogenizează. Se transvazează 0,3 ml din acest amestec în al doilea tub cu 3 ml mediu, se omogenizează și se transvazează 0,3 ml în al treilea tub tot cu 3 ml mediu.

■ **Urina și sedimentul urinar.** Se însămânțează 1—2 picături per tub cu cca 5 ml din proba ca atare și diluată 1:10.

■ **Omogenatele tisulare** sunt inițial diluate prin modul de preparare (2 g probă/5 ml fluid).

Probele contaminate sunt însămânțate în mediu cu 5-fluorouracil 200—400 μg/ml, pentru a preveni invadarea mediului de către organismele de contaminare.

Pentru izolarea *in vivo* se folosesc cobai tineri (100—200 g) care sunt injectați intraperitoneal. Izolarea din probe de apă este mai indicată să se facă prin inoculare percutană (revedi partea întâi, 9.3.2). Se urmăresc animalele inoculate timp de 14—21 zile. De la cadavre sau animale sacrificate se prelevă sânge, fragmente de ficat, rinichi, plămâni pentru microscopie, reizolare *in vitro* și identificare.

Identificarea leptospirelor izolate se efectuează prin studiul:

■ **caracterelor de cultură** (vezi mai sus);

■ **caracterelor microscopice** (vezi mai sus);

■ **sensibilității** la 8-azaguanină sau 2,6-diaminopurină (*L. interrogans* este sensibilă, *L. biflexa* rezistentă);

- patogenității experimentale;
- structurii antigenice prin reacția de aglutinare-liză cu seruri imune anti-*Leptospira* specifice de serogrup și serovar (vezi mai jos).

30.2.2. Diagnosticul serologic

Anticorpilor anti-*Leptospira* pot fi decelați după 7—8 zile de boală. Titrul lor ajunge maxim în săptămânile 3—4, apoi scade și se menține la valori mici luni (anticorpilor fixatori de complement) sau ani de zile după vindecare (aglutininele).

■ *Reacția de fixare a complementului* se efectuează cu antigenul specific de gen preparat din *L. biflexa* tulpina Patoc I. Creșterea de cel puțin 4 ori a titrului constatată în serurile perechi recoltate la intervale de cca 8 zile în cursul celor 2—4 săptămâni de observație a pacienților confirmă diagnosticul de leptospiroză fără a putea preciza serogrupul infectant.

■ *Reacția de aglutinare-liză* (RAL) este sensibilă și specifică, precizează serogrupul și serovarul, dar este accesibilă numai laboratoarelor care întrețin în colecție tulpinile serogrupurilor și serovarurilor de *Leptospira* circulante în zonă.

În tuburi se diluează serul suspect de la 1:50 la \geq 1:1600. Pe lame de microscop, se amestecă o picătură din cultura vie a tulpinii fiecărui serogrup de *Leptospira* cu o picătură de diluție a serului. Se acoperă picăturile cu câte o lamelă și se incubează preparatul în cameră umedă timp de 15—20 minute, după care se citește reacția la microscopul cu fond negru. *RAL pozitivă*: leptospirele din serogrupul corespunzător anticorpilor se aglutinează sub formă de gheme stelate (păianjen), devin imobile, se dezagregă granular și dispar. La diluții mai mari ale serului poate să se manifeste numai aglutinarea. *RAL negativă*: leptospirele rămân dispersate uniform cu morfologia și mișcările caracteristice. Diluția până la care mai apare RAL pozitivă indică titrul serului. Titruri mai mari de 1:200 sunt sugestive, iar creșterea de cel puțin 4 ori a titrului în cursul bolii confirmă leptospiroza și indică serogrupul și serovarul infectant.

Teste serologice noi utilizate pentru serodiagnosticul leptospirozelor sunt: ELISA, reacția de hemaglutinare indirectă etc.

30.2.3. Biopreparate folosite pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și terapia leptospirozelor

- Seruri imune anti-*Leptospira* de grup și variantă utilizate pentru identificarea tulpinilor izolate.
- Colecția de leptospire cu tulpini din fiecare serogrup pentru montarea RAL.
- Antigen *Leptospira biflexa* Patoc I, cu specificitate de gen, pentru RFC.
- Suspensie de eritrocite sensibilizate cu antigen *Leptospira* pentru RHAI.
- Vaccin anti-*Leptospira* (suspensie polivalentă de leptospire omorâte) pentru vaccinarea persoanelor din grupuri cu risc.
- Imunoglobulină anti-*Leptospira* utilă în tratamentul bolii.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE *ENTEROBACTERIACEAE*

31.1. DATE GENERALE

31.1.1. O minidefiniție

Enterobacteriaceele sunt bacili gramnegativi, nesporulați, mobili, cu flageli peritrichi, sau imobili. Nepretențioși nutritiv, cresc pe medii cu peptonă în prezența bilei. Fermentează glucoza, sunt oxidazonegativi, produc catalază și reduc nitrații în nitriți.

31.1.2. Reper taxonomice și habitat

Familia *Enterobacteriaceae* reunește cca 30 de genuri cu peste 100 de specii, care habitează intestinul omului și animalelor, fiind răspândite cu fecalele pretutindeni în mediul ambiant.

La genurile clasice de *Enterobacteriaceae* (tabelul 31.1) taxonomiștii propun adăugarea a noi genuri: *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Erwinia*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella*.

Tabelul 31.1. Genurile și speciile de *Enterobacteriaceae* cu interes clinic mai frecvent (în ordinea alfabetică)

Genuri	Specii și subspecii
<i>Citrobacter</i>	<i>C. amalonaticus</i> <i>C. diversus</i> <i>C. freundii</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. gergoviae</i> <i>E. sakazakii</i>
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> <i>E. fergusonii</i> <i>E. hermanii</i> <i>E. vulneris</i> ș. a.
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>

Tabelul 31.1 (continuare)

Genuri	Specii și subspecii
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>aerogenes</i> ssp. <i>oxytoca</i> ssp. <i>pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> <i>P. vulgaris</i>
<i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens</i> <i>P. rettgeri</i> <i>P. rustigianii</i> <i>P. stuartii</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ssp. <i>salamae</i> ssp. <i>arizonae</i> ssp. <i>diarizonae</i> ssp. <i>houtenae</i> ssp. <i>bongori</i> ssp. <i>indica</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i> <i>S. marcescens</i> <i>S. odorifera</i>
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. boydii</i> <i>S. sonnei</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> (grup cu 5 biogrupuri) <i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

Se cunosc specii de enterobacteriacee patogene și specii condiționat patogene.

Enterobacteriile patogene întâlnite la bolnavi și purtători sănătoși sunt din genurile: *Shigella*, agenții cauzali ai dizenteriei bacteriene, *Salmonella* tifoidice (*S. typhi*, *S. paratyphi* A, B sau C), cauză a febrei tifoparatifoidice, *Yersinia pestis*, agentul pestei. Alte specii, comensale ale microflorei intestinale, sunt condiționat patogene și pot fi cauză de toxinfecții alimentare, boală diareică, infecții nozocomiale (de spital) supurative ori septicemice cu declanșare de șoc endotoxinic.

Enterobacteriaceele cultivă pe medii uzuale și formează, după 24 ore de incubare la 37°C, pe suprafața mediilor agarizate colonii S de 1–3 mm diametru, rotunde, ușor convexe. Capacitatea de fermentare a lactozei le imparte în specii lactozopozitive și specii lactozonegative, un criteriu practic de diferențiere preliminară. De aceea mediile de izolare, diferențiale sau selective, a acestor bacterii din produse contaminate sunt medii lactozate. Genurile patogene sunt lactozonegative (*Salmonella*, *Shigella*), cele condiționat patogene sunt unele lactozonegative (*Edwardsiella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Proteus*, *Providencia*), altele lactozopozitive (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Kluyvera*, *Rah-*

nella), iar altele, în raport cu specia, pot fi lactozopozitive sau negative (*Klebsiella*, *Serratia*, *Yersinia*).

Mediile diferențiale lactozate (e. g. geloză lactozată cu indicator de pH bromcrezol purpur sau albastru de bromtimol) se folosesc pentru izolarea enterobacteriaceelor din prelevate necontaminate sau pentru purificarea izolatelor de pe medii selective.

Mediile selective pentru enterobacteriacee se clasifică în medii slab, moderat și înalt selective. Această clasificare este importantă pentru alegerea celui mai indicat mediu de izolare în diagnosticul bacteriologic al enterobacteriozelor. În afară de capacitățile inhibitorii față de flora asociată, mediile selective pentru enterobacteriacee mai trebuie să inhibe și caracterul invaziv al culturii de *Proteus*, bacterie care contaminează frecvent prelevatele patologice în care le urmărim.

■ **Mediile slab selective:** e. g. Endo (agentul selectiv: sulfitul de sodiu și fucsina), Levin (agentul selectiv: albastru de metilen), Mac Conkey (agenții selectivi: sărurile biliare + cristal violet) sunt indicate pentru izolarea enterobacteriaceelor, mai ales *E. coli* și bacilii coliformi din prelevate slab contaminate (e. g. urină, aspirat duodenal ș. a.). Unele tulpini de *Shigella* cultivă numai pe asemenea medii.

■ **Mediile moderat selective:** e. g. Leifson (agent selectiv: dezoxicolat de sodiu), *Salmonella-Shigella*, abreviat SS (agenții selectivi: săruri biliare + verde brilliant), Ploskirev etc. sunt indicate curent pentru coproculturi și pentru izolarea enterobacteriaceelor patogene din prelevate cu floră de asociație (bilă, vomă, probe necroptice, alimente, materii fecale).

■ **Mediile înalt selective:** e. g. Wilson-Blaire (agent selectiv : verde brilliant) indicat pentru izolarea salmonelelor, în special *S. typhi*, din materiile fecale. Este singurul mediu care nu diferențiază pe baza fermentării lactozei sau altor zaharuri, ci prin capacitatea salmonelelor de a reduce sulfitul de bismut în sulfură de bismut, care dă culoarea neagră a coloniilor de *Salmonella* selectate.

Pentru identificarea preliminară a enterobacteriaceelor se folosesc pe larg mediile multitest cum sunt mediile: Klinger (două zaharuri plus fier), Olkenițki (trei zaharuri + fier + uree), Russel etc., care orientează testele ulterioare de identificare.

Identificarea genului și speciei izolatelor se face pe baza caracterelor fenotipice cultural-biochimice, completate cu identificarea antigenică, lizotipia, colicinotipia, antitibiograma.

Cenul se determină prin studiul *caracterelor biochimice primare*: utilizarea citratului de sodiu, malonatului, mobilitatea, formarea de H_2S , testul cu roșu metil (gradul acidifierii în bulionul glucozat Clark-Lubs), testul Voges-Proskauer (formare de acetoină în bulionul Clark-Lubs), producerea de urează, fenilalanindezaminază, lizindecarboxilază (vezi tabelul 32.2).

În cadrul genurilor, se identifică speciile prin studierea *testelor secundare de activitate biochimică*: formarea de indol, fermentarea lactozei, manitei, salicinei, xilozei, arabinozei și altor glucide; scindarea ornitinei, argininei, utilizarea acetatului, tartratului, mucatului; creșterea pe mediul cu cianură de potasiu (KCN) etc. coroborate cu determinarea structurii antigenice.

În structura antigenică a enterobacteriaceelor reținem trei categorii de antigeni cu interes pentru identificarea și patogenitatea acestor bacterii: H (flagelar), O și R (somatice) și K (capsular).

■ **Antigenii flagelari (H)** sunt proteici, termolabili, distruși de alcool, dar prezervați prin formol. Au specificitate de tip. Cu anticorpii omologi formează rapid aglutinate floconoase.

■ **Antigenii somatici O și R**, structural, sunt parte integrantă a lipopolizaharidei (LPZ) din membrana externă.

Antigenul O reprezintă partea cea mai distală a LPZ, formată din unități monozaharidice repetate. Imprimă suprafeței bacteriene hidrofilia și încărcătura electronegativă caracteristice formelor de cultură S. Are specificitate de grup, este termostabil, distrus prin formol, dar prezervat prin alcool. Cu anticorpii omologi aglutinează granular și lent.

■ *Antigenii R* reprezintă porțiuni ale miezului polizaharidic al LPZ. Prin mutații apar 5 grade de deficiență a sintezei LPZ: de la mutații Ra, deficienți numai pentru sinteza antigenului O, până la cei Re, care sintetizează numai acidul ketodeoxioctonic, ce leagă miezul polizaharidic de lipidul A. Mutații Rb—Re aglutinează spontan în soluții saline izotone. Cei Ra, deși formează suspensii stabile, reacționează încrucișat cu multe seruri anti-O, mai ales în reacțiile de aglutinare pe lamă; pot fi recunoscuți prin aglutinarea spontană în soluții 1:500 de acriflavină.

■ *Antigenii K* sunt poliozide capsulare sau proteine reprezentate de pili peritrichi. Au specificitate de tip.

31.2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE *ESCHERICHIA*

31.2.1. Date generale

31.2.1.1. *O* minidefiniție

Genul *Escherichia* reunește enterobacteriaceele mobile, lactozopozitive, care fermentează zaharurile cu formare de acid și gaz, dau testul cu roșu metil pozitiv, produc lizindecarboxilază, formează indol, utilizează acetatul de sodiu, dar nu utilizează citratul de sodiu, nu formează acetoină (testul Voges-Proskauer negativ), nu produc fenilalanindezaminază și nici urează.

31.2.1.2. *Repere taxonomice*

În prezent sunt cunoscute 5 specii de *Escherichia*: *E.coli*, specia tip și cea mai importantă prin răspândire și potențial patogen, *E.fergusonii*, *E.hermanii*, *E.vulneris* și *E.blattae*.

La *E.coli* au fost identificate 171 antigeni O, 60 antigeni H și peste 100 antigeni K. Din combinațiile posibile ale acestor antigeni rezultă un număr enorm de serovaruri.

Antigenii K sunt împărțiți în două grupe: grupul I termostabil (rezistă o oră la fierbere) și grupul II termolabil (distrus prin fierbere timp de o oră). Majoritatea sunt poliozide codificate cromozomial. Numai câțiva antigeni K din grupul III sunt proteine codificate plasmidic și dispuse ca fimbrile pe suprafața bacteriană (e. g. K88 și K99).

Excepție făcând trusele cu seruri aglutinante pentru tulpinile enteropatogene de *E.coli* (vezi mai jos), serotiparea tulpinilor de *E.coli* este de competența centrului național de referință. În aceste condiții, laboratoarele clinice pot folosi ca marker epidemiologic pentru tulpinile de *E.coli* «rezistograma» (spectrul de rezistență la antibiotice), care are

capacitate de discriminare satisfăcătoare, mai ales când include determinanți de rezistență la antibiotice nou utilizate sau la antibiotice de rezervă.

31.2.1.3. Habitat

E.coli este constituent permanent al microflorei normale din intestinul gros, unde realizează concentrații de $2-3 \cdot 10^8$ UFC/g de fecale. Servește ca indicator microbiologic sanitar de poluare fecală a mediului ambiant (titrul și indicele de bacterii coliforme totale sau de bacterii coliforme fecale). Joacă rol important în fiziologia colonului și ca antagonist al microflorei tranzitorii. Tulpinile cu habitat uman sunt diferite de cele cu habitat animal.

E.blattae este găzduită de specii ale gândacilor de bucătărie și nu prezintă importanță pentru om. Celelalte specii ale genului sunt izolate ocazional din materii fecale și prelevate patologice de la om, dar cu semnificație clinică nedemonstrată.

31.2.1.4. Factori de patogenitate

Echipamentul de patogenitate al *E.coli* este foarte variabil, fiind în cea mai mare parte codificat plasmidic și de profagi.

Codificare cromozomială au antigenii O și antigenii K polizaharidici, care funcționează ca factori antifagocitari și protectori față de complement cât timp nu a apărut răspunsul imun umoral specific.

Prin transfer genetic *E.coli* realizează fenotipuri patologice: diareigene, uropatogene și bacteriemice.

a) Fenotipurile diareigene:

■ Tulpinile enteropatogene infantile de *E.coli* (EPEC) aparțin unui număr limitat de serogrupe O: 18ac; 20; 25; 26; 44; 55; 86; 111; 114; 119; 125; 126; 127; 128 și 142. Factorii de patogenitate identificați: o proteină de membrană externă, codificată plasmidic, cu funcție de ligand la enterocite și o toxină shiga-like produsă prin conversie lizogenică.

■ Tulpinile enteroinvazive de *E.coli* (EIEC) aparțin mai frecvent serogrupelor O: 28ac; 112ac; 124; 136; 143; 144; 152 și 164, care îmbolnăvesc atât copiii, cât și adulții. Capacitatea enteroinvazivă este asigurată de proteine din membrana externă codificate plasmidic.

■ Tulpinile enterotoxigene de *E.coli* (ETEC) aparțin mai frecvent serogrupelor O: 6; 8; 15; 25; 27; 63; 78; 148 și 159. Afectează pacienți de orice vârstă. Au factori de patogenitate codificați plasmidic: aderența la enterocite și enterotoxigeneză.

Colonizarea intestinului subțire uman este asigurată prin pili numiți CFA (Colonization Factor Antigen): e. g. CFA I, CFA II, 987P, CFA III.

Enterotoxina termolabilă, asemănătoare toxinei holerice, activează adenilatciclaza din membrana enterocitelor și determină eliminarea apei și electroliților din plasmă în intestin. Enterotoxina termostabilă este un activator al guanilatciclazei cu efecte similare.

Tulpinile ETEC au specificitate de gazdă prin factorii lor de colonizare: tulpini umane, tulpini porcine (pili K88), bovine (pili K99) etc., deși enterotoxinele sunt identice.

Tulpinile enterohemoragice de *E.coli* (EHEC) aparțin în majoritate serogrupului O 157. Produc, prin conversie lizogenică, o familie de 3 toxine shiga-like.

b) Fenotipurile uropatogene de *E.coli* au pili care se fixează pe receptori ai uroepiteliului structural similari antigenilor de grup sangvin P și M.

c) Fenotipurile bacteriemice au un arsenal de patogenitate codificat cromozomial (antigeni O și K polizaharidici) și plasmidic (hemolizina, un chelator de fier, o toxină termolabilă letală pentru iepuri, șoareci și găini). Aparțin mai frecvent serogrupelor O: 1; 2; 4; 6; 7; 8; 9; 11; 18ab; 22 și 75.

31.2.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu *E. coli*

Receptivitatea la infecția cu fenotipurile diareigene de *E. coli* este generală, doza infectantă fiind de ordinul a 10^{8-9} UFC. Diareea cu tulpinile EPEC după vârsta de 2 ani este excepțională, deoarece infecții aparente sau inaparente cu acest fenotip imunizează încă la vârste foarte mici.

Receptivitatea la infecțiile cu tulpinile uropatogene de *E. coli* ține de statusul non-secretor al antigenilor de grup sanguin P și M. La persoanele cu status secretor acești antigeni, prezenți în umori (inclusiv urină), neutralizează capacitatea adezivă a *E. coli* la uroepiteliu.

Receptivitatea la infecțiile cu fenotipurile bacteriemice de *E. coli* ține de deficiențe locale ale barierelor antiinfecțioase (plăgi, plaga uterină post-partum sau post-abortum, deficite ale transportului mucociliar traheobronșic), care deschid calea infecțiilor septice parenterale. Hipo- și agamaglobulinemia sau deficite selective ale anticorpilor din clasa IgM ori ale componentei C3 a complementului măresc receptivitatea la infecția cu aceste tulpini.

■ La nou-născuți receptivitatea față de infecțiile bacteriemice cu *E. coli* ține de trei factori:

- frecvența *translocării bacteriene prin epiteliul intestinal* (vezi 14.4.2);
- *absența anticorpilor IgM materni*, care ar putea proteja nou-născutul de infecții cu bacili gramnegativi, dar nu traversează bariera placentară;
- colonizarea intestinului cu o tulpină de *E. coli* K1.

Antigenul K1 ocupă un loc aparte în arsenalul de patogenitate al tulpinilor bacteriemice de *E. coli*. Are determinanți antigenici comuni cu polisialozilglicopeptidele cerebrale prezente la nou-născuți, ca atare, este recunoscut ca structură proprie și nu stimulează formarea de anticorpi. Pe măsură ce cantitatea acestor determinanți antigenici din țesuturile proprii scade, organismul devine reactiv la antigenul K1 de *E. coli*. Astfel peste 80% din tulpinile de *E. coli* izolate din meningite neonatale și peste 40% din cele izolate din septicemii neonatale au antigeni K1.

31.2.1.6. Infecțiile cauzate de *E. coli*

E. coli este o cauză importantă a *bolii diareice acute* în colectivități cu condiții precare de sanitație, care favorizează transmiterea masivă fecal-orală. Sunt o cauză frecventă a «diareei turiștilor». Tulpinile EPEC cauzează izbucniri epidemice de *gastroenterite infantile*, cele EIEC *sindrom diareic dizenteriform*, cele ETEC *sindrom diareic holeriform*, iar cele EHEC *enterocolită hemoragică* însoțită, mai ales la copii și vârstnici, cu sindrom uremic hemolitic.

În patologia infecțioasă modernă *E. coli* este bacteria cea mai frecvent implicată în *infecții extraintestinale*. Determină aproape 90% din *infecțiile tractusului urinar*. Uretrocis-

tite pot determina oricare din tulpinile de *E.coli* rezidente în colon, iar pielonefrite determină tulpinile uropatogene.

E.coli este prima cauză a meningitelor neonatale și determină frecvent septicemii neonatale.

Infecții ale plăgilor, arsurilor, infecții uterine post-partum sau post-abortum, infecții pulmonare pot fi determinate de tulpini bacteriemice ale *E.coli*. Este asociată în peritonite secundare perforațiilor intestinale.

Multe din infecțiile cu *E.coli* evoluează ca izbucniri epidemice intraspitalicești.

31.2.2. Investigația etiologică a escherichiozelor

31.2.2.1. Diagnosticul microbiologic

31.2.2.1.1. Prelevate patologice

În escherichiozele intestinale se examinează scaunul diareic și, când există, voma. În variatele infecții extraintestinale cauzate de *Escherichia* se prelevă și se examinează: urină, exsudate purulente, spută, biopsii, hemoculturi, lichid cefalorahidian.

31.2.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă pe frotiul colorat Gram are numai valoare orientativă când depistează bacili gramnegativi în prelevate din infecții extraintestinale. Există truse cu imunoglobuline anti-*E.coli*, polivalente și monospecifice, marcate fluorescent pentru identificarea preliminară rapidă a tulpinilor EPEC implicate în diareea infantilă.

31.2.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează prelevatul patologic pe o placă cu mediul Endo sau Levin. Probele de scaun diareic sunt epuizate și pe un mediu moderat selectiv (e. g. Ploskirev, Leifson etc.), pentru a nu omite depistarea shigelelor ori salmonelilor eventual implicate în etiologia diareei. Se incubează plăcile peste noapte la 37°C.

Etapa II. Se urmăresc coloniile cu diametrul de 1—3 mm, rotunde, ușor convexe, lactozopozitive, cu luciu metalic pe mediile Endo sau Levin. În cazul prelevatelor din infecții extraintestinale se repică 2—3 colonii sugestive, pentru a obține cultura pură stock necesară identificării.

În coproculturi coloniile serovarurilor comensale de *E.coli* nu diferă de cele ale serovarurilor diareigene, de aceea se triează mai multe colonii suspecte prin reacția de aglutinare pe lamă cu serul imun anti-*E.coli* polivalent OKA, amestec de seruri imune față de serovarurile mai frecvent patogene. Coloniile care au reacționat pozitiv cu serul OKA se repică pe mediul multitest Olkenițki sau Klinger.

Cultura de *E.coli* însământată în mediul Olkenițki se manifestă prin fermentarea glucozei, zaharozei și lactozei cu formare de acid și gaz, fără formare de H₂S și fără scindarea ureei.

Etapa III. Se confirmă identitatea izolatelor suspecte a fi *E.coli* și se identifică serovarul prin studiul eşalonat al următoarelor caractere:

a) *Microscopice*: bacili gramnegativi, mobili.

b) *De cultivare*: vezi mai sus.

c) *Testul oxidazei negativ*.

d) *Testele biochimice primare și secundare*: mobilitate pozitivă, reacția cu roșu metil pozitivă, reacția Voges-Proskauer negativă, formare de indol, dar nu de H₂S, creșterea pe mediul cu acetat de sodiu, dar nu pe mediul cu citrat de sodiu (Simmons), formare de lizindecarboxilază, absența ureazei și a fenilalanindezaminazei.

e) *Structura antigenică*. Se aglutinează pe lamă cultura pură, pe rând, cu serurile polivalente OKA, OKB, OKC, OKD și OKE, apoi cu seruri OK monospecifice. Tulpinile cu antigen K de grup II, termolabil, pot fi inaglutinabile prin anticorpii anti-O. Fierberea o oră distruge antigenul K de grup II și demască antigenul O. De aceea se vor face aglutinările pe lamă paralel cu cultura pură vie și cu cultura omorâtă prin fierbere.

Se efectuează *antibiograma*.

Etapa IV. Se analizează și se interpretează rezultatele. Se redactează buletinul de analiză precizând: «*E.coli*, serovarul..., *antibiograma*...».

31.2.2.2. *Diagnosticul serologic*

Exceptional (e. g. infecții mixte, infecții pulmonare fără certitudinea semnificației clinice a *E.coli* izolate) se recurge la autoserodiagnostic prin reacția de aglutinare în tuburi, folosind ca antigen tulpina izolată de la bolnav. Este semnificativ un titru al aglutininelor mai mare de 1:200. Diferențierea clasei de imunoglobuline anti-*E.coli* implicată în reacție dă relații importante: în infecția acută predomină anticorpii IgM, la purtători cei IgG.

31.2.2.3. *Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și tratamentul escherichiozelor*

■ Set de seruri imune anti-*E.coli* polivalente: OKA, OKB, OKC, OKD, OKE și seruri adsorbite monospecifice pentru identificarea serovarurilor patogene.

■ Seruri imune fluorescente anti-*E.coli* polivalent și monospecifice pentru serovarurile EPEC mai frecvent izolate în regiune.

■ Preparate eubiotice pentru tratamentul escherichiozelor intestinale: bifidobacterină, lactobacterină, colibacterină, care se prescriu după antibioticoterapie.

31.3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI BACTERIENE

Dizenteria bacteriană, o boală infecțioasă larg răspândită, este cauzată de specii din genul *Shigella* și se manifestă prin colită acută cu febră, colici abdominale, tenesme, diaree cu scaune frecvente mucopurulente sau sangvinolente.

31.3.1. Date generale

31.3.1.1. O minidefiniție

Shigelele sunt *Enterobacteriaceae* imobile, lactozonegative, care fermentează zaharurile fără producere de gaz (puține excepții cu producere minimă de gaz). Dau reacția cu roșu metil pozitivă și Voges-Proskauer negativă. Nu utilizează citratul sau malonatul ca unică sursă de carbon. Nu cresc pe mediul cu KCN. Nu produc H_2S , urează, fenilalanindezaminază sau lizindecarboxilază.

31.3.1.2. Repere taxonomice

Genul *Shigella* are patru specii:

■ *Shigella dysenteriae* cu 12 serovaruri (1—12).

■ *Shigella flexneri* are un complex antigenic cu fracțiuni de variantă și de grup. Se disting 6 serovaruri cu 14 subserovaruri. Serovarurile 1—15 sunt diferențiate în 15 biovaruri, iar serovarul 6 în 7 biovaruri.

De la bolnavi se izolează mai frecvent *S. flexneri* 2a, 2b, 1a, 6, iar în unele localități din sudul republicii se izolează un nou serovar de *S. flexneri* 1V:7,8.

Shigella boydii cu 18 serovaruri, rar izolate ca agenți cauzali ai dizenteriei pe teritoriul țării.

■ *Shigella sonnei* este antigenic omogenă și se diferențiază în 7 biovaruri.

■ *Shigella dysenteriae* este manitonegativă. Celelalte specii sunt manitopozitive (excepție biovarurile 4aMn⁻ și 6 Manchester). Astfel fermentarea manitei ne ajută mult în diferențierea primară a shigelelor.

31.3.1.3. Habitat

Shigelele sunt patogene pentru om și alte primare. Excepțional numai au fost semnalate infecții la câini, alte animale fiind rezistente. Așadar, practic, sursă de infecție sunt bolnavii cu dizenterie și purtătorii de *Shigella*.

În mediul ambiant sunt organisme relativ fragile. *S. dysenteriae* supraviețuiește 1—2 ore. *S. flexneri* persistă 1—3 săptămâni în apa potabilă și până la 2 luni în produsele lactate. *S. sonnei* se multiplică ușor în alimente până la concentrații de 10^{5-6} cu posibilitatea determinării de toxiinfecții alimentare.

31.3.1.4. Factori de patogenitate

Shigelele sunt bacterii enteroinvazive. Produc *neuraminidaze*, care, prin liza glicocalixului, le favorizează apropierea de membrana microviloză a enterocitelor și *penetrarea intraepitelială*. În enterocite se multiplică și determină *citoliză* cu apariția de ulcerații. *Antigenul K* protejează shigelele de fagocitoză.

În etapa următoare a bolii intervin *toxinele: exotoxine proteice și endotoxina*. Serotipul 1 de *S. dysenteriae* produce în cantități mari o exotoxină, care interferează sinteza proteică cu efecte citotoxice, enterotoxice (pierdere hidroelectrolitică prin intestin) și neurotoxice (meningism, comă la bolnav; paralizii și moartea după inoculare la animale). Toxine similare (*shiga-like*) produc, prin conversie lizogenică, și alte shigele, dar au numai efect citotoxic.

31.3.1.5. Dizenteria

Ingerate în doze de 10—100 bacili o dată cu apa, alimentele sau pur și simplu transportare prin degetele contaminate fecal, shigelele provoacă după o incubajie de 2—4 zile dizenteria, o enterocolită infecțioasă acută. Mucoasele colonului și ileonului terminal sunt congestive, edemațiate și infiltrate. Microabcese și ulceratii acoperite de false membrane, formate din fibrină, leucocite PMN, hematii, resturi celulare, mucus și bacterii sunt diseminate cu densitate mai mare pe mucoasa rectosigmoidiană. Boala evoluează spre vindecare în 2—5 zile la majoritatea pacienților. Evoluția este mai gravă la copii și bătrâni, din cauza toxemiei și dezechilibrului hidroelectrolitic. Vindecarea microbiologică urmează curând după cea clinică. Numai puțini pacienți rămân purtători cronici cu recurențe ale bolii.

Cele mai grave forme de boală le determină serovarul 1 de *S.dysenteriae*, bacilul lui Shiga-Kruse, care a dispărut din Europa în anii 1150, dar cu pericol de reimplantare din zonele endemice (Subcontinentul Indian, America Centrală, Africa). *S.sonnei* determină forme benigne ale dizenteriei.

31.3.2. Investigația etiologică a dizenteriei

31.3.2.1. Diagnosticul microbiologic

31.3.2.1.1. Prelevate patologice

Probele din scaun emis spontan (fără contaminare cu urină) sunt cele mai indicate. Se selectează cu lingurița coprocultorului porțiunile mucopurulentsangvinolente din scaun și se suspensează în mediul de transport (cel mai indicat mediu este Cary-Blair, alternativ tampon fosfat cu pH 7,6 sau măcar soluție 3% de NaCl). Rar se recurge la prelevarea cu tampoane sau sonde rectale.

31.3.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă pe preparat umed între lamă și lamelă sau pe frotiu Gram depistează în primul rând reacția inflamatorie, cu predicție pozitivă satisfăcătoare în zonele unde *Shigella* este agentul predominant al bolii diareice cu sindrom dizenteriform.

Microscopia pe preparate colorate imunofluorescent cu seruri antidizenterice (*S.flexneri*, *S.sonnei*, *S.dysenteriae* 1,2) permite rapid, în 1—2 ore, diagnosticul etiologic al dizenteriei bacteriene acute.

31.3.2.1.3. Izolarea și identificarea

Izolarea și identificarea sunt decisive și de bază.

Etapa I. Se epuizează probele de scaun pe mediile selectiv-diferențiale Endo, Levin, Ploskirev sau SS și, paralel, se însămânțează în mediul de îmbogățire cu selenit acid de sodiu. Se incubează mediile însămânțate peste noapte la 37°C.

Etapa II. Se urmăresc pe plăci coloniile suspecte de *Shigella*: lactozonegative (incolore), de tip S sau R și se repică pe mediul dizaharat Klinger sau trizaharat Olkenițki. Se epuizează proba incubată în mediul de îmbogățire pe placă cu mediu selectiv-diferențial.

Etapa III. Cultura de *Shigella* însămânțată în mediul Olkenițki se manifestă prin fermentarea glucozei fără gaz (cu excepția biovarurilor Manchester și Newcastle ale

serovarului 6 de *S.flexneri*, care produc cantități minime de gaz), absența fermentării lactozei și zaharozei (cu excepția a foarte puține tulpini de *S.flexneri* și *S.sonnei* și a 33% din tulpinile serovarului 9 de *S.boydii*), fără formare de H₂S și fără scindarea ureei.

Izolatele în cultură pură se identifică pe baza următoarelor caractere:

a) *Microscopice*: bacili gramnegativi mobili.

b) *De cultură*: vezi mai sus.

c) *Testele biochimice primare și secundare*: reacția cu roșu metil și Voges-Proskauer, mobilitatea, formarea de H₂S, de indol, prezența ureazei, fenilalanindezaminazei, lizindecarboxilazei, utilizarea citratului de sodiu sau acetatului de sodiu, scindarea lactozei 4%, salicinei, ornitinei etc.

d) *Structura antigenică*. Se aglutinează pe lamă cultura pură cu seruri imune anti-*Shigella* polivalente de specie și monospecifice adsorbite de variantă și grup.

Pentru shigelele manitopozitive ordinea reacțiilor de aglutinare la seroidentificare este:

- cu ser aglutinant polivalent anti-*S.flexneri* (1—6);
- cu ser aglutinant anti-*S.sonnei*;
- cu ser aglutinant polivalent anti-*S.flexneri* (I—V);
- cu ser aglutinant de variantă anti-*S.flexneri* (VI);
- cu serurile aglutinante monospecifice de variantă anti-*S.flexneri* I, II, III, IV, V;
- cu serurile aglutinante monospecifice de grup anti-*S.flexneri* 3, 4, 6, 7, 8, pentru determinarea subserovarului;
- cu serurile aglutinante polivalente anti-*S.boydii* de variantă (1—18), grupate în 3 amestecuri.

Specia manitonegativă, *S.dysenteriae* se identifică prin aglutinare cu serurile imune polivalente (1—2, 3—7, 8—12) și monospecifice de variantă 1—12.

e) *Fagoidentificarea* culturii de *Shigella* se face cu bacteriofagii polivalenți și monovalenți (*S.flexneri*, *S.sonnei*, *S.dysenteriae* și *S.boydii*).

f) *Virulența* determinată prin *testul Serény al cheratoconjunctivitei la cobai* (capacitatea invazivă) sau prin *efectul citotoxic pe culturi celulare*; infectarea intranasală a șoarecilor albi (pneumonie) sau a oului embrionat (efect letal).

g) *Antibiograma*.

Etapa IV. Se analizează și se interpretează rezultatele, după care se redactează buletinul de analiză. E. g. «Am izolat *S.flexneri* subserovarul 2a, biovarul 9, antibiograma: sensibilă la biseptol...; rezistentă la tetraciclină etc.».

31.3.2.2. Diagnosticul serologic

Are numai valoare retrospectivă de confirmare a etiologiei infecției. Se folosesc reacția de aglutinare, reacția de hemaglutinare indirectă, ELISA sau reacția de imuno-fluorescență indirectă. Pot fi determinați coproanticorpii și anticorpii salivari (IgA secretori anti-*Shigella*).

Titrul diagnostic al aglutininelor anti-*S.flexneri* la adult este de cel puțin 1:400 și anti-*S.sonnei* de cel puțin 1:200; la copii titrul diagnostic este de cel puțin 1:100 pentru

toate etiologiile dizenteriei bacteriene. Decisivă este creșterea de cel puțin 4 ori a titrului aglutininelor anti-*Shigella* în probe de ser prelevate la 5—7 zile interval.

31.3.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul, tratamentul și profilaxia dizenteriei

■ Seruri imune anti-*Shigella* adsorbite polivalente de specie, variantă și grup pentru identificarea antigenică a tulpinilor de *Shigella* izolate în cultură pură.

■ Bacteriofagii antidizenterici (drajeuri, preparat lichid) pentru identificarea fagică, tratament și profilaxie.

■ Suspensii omorâte de *S.flexneri*, *S.sonnei* și *S.dysenteriae* 1, 2 pentru serodiagnosticul bolii.

■ Suspensii de hematii formolate și sensibilizate cu antigeni *S.flexneri*, *S.sonnei* etc. pentru reacția de hemaglutinare indirectă.

■ Bifidobacterină, lactobacterină, colicină pentru restabilirea ecologiei microflorei intestinale.

■ Vaccinuri antidizenterice omorâte, vaccinuri ribozomiale în scopul imunoprofilaxiei.

31.4. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SALMONELOZELOR

31.4.1. Date generale

31.4.1.1. O minidefiniție

Salmonelele sunt enterobacteriacee mobile, lactozonegative. Atacă zaharurile fermentativ cu producere de gaz. Uzual formează H_2S , utilizează citratul ca unică sursă de carbon (cresc pe mediul Simmons) și produc lizin- și ornitindecarboxilază. Rar produc indol și nu produc acetoină (reacția Voges-Proskauer negativă), urează sau fenilalanindezaminază. O importantă excepție, serovarul Typhi nu produce gaz și este citratnegativ.

31.4.1.2. Repere taxonomice și nomenclatură

Taxonomia salmonelilor a suferit modificări profunde în anii 80 după analiza lor prin tehnica ADN recombinant. Astăzi este recunoscută specia *Salmonella enterica* cu 7 subspecii: *enterica* (sinonim *cholerae* suts), *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* și *indica*).

Conform schemei de clasificare stabilită de Kauffmann și White, antigenul O împarte salmonellele în 66 serogrupuri, fiecare individualizată prin mai mulți antigeni O, dintre care unul major. Antigenii O sunt marcați cu cifre arabe, iar serogrupurile cu litere majuscule ale alfabetului de la A la Z (corespunzătoare antigenilor O2—50) și, în continuare, numeric de la O51 la O67. În cadrul serogrupurilor, antigenii H definesc serovarurile al căror număr crește mereu: în 1988 se cunoșteau 2200. Majoritatea serovarurilor (59,5%) aparțin subspeciei *S.enterica* și dintre acestea 96,5% fac parte din serogrupurile O de la B la E₄. Antigenul H are două faze:

■ **faza 1**, numită cu literele mici ale alfabetului de la a la z (fără j) și în continuare cu z și un indice numeric (z₁ la 68);

■ **faza 2**, numită cu cifre de la 1 la 12; uneori are și unul sau mai mulți antigeni ai fazei 1 din seria e, n, w, x, y, z. Există o variație de fază a antigenului H: tulpini ale aceluiași serovar pot avea antigenul H în ambele faze sau numai în una din ele.

În trecut serovarurile de *Salmonella* aveau denumire binară, care le acorda fals rang de specie: e. g. *S.typhi*, *S.typhimurium*, *S.paratyphi A*, *S.paratyphi B* (*S.schotmuelleri*) ș. a. Pentru a evita aceste confuzii, nomenclatura actuală indică specia sau subspecia cu caractere italice, iar serovarul cu caractere obișnuite: e. g. *Salmonella enterica* subspecia *enterica* Typhi, Typhimurium, Enteritidis ș. a. (și nu *S.typhi*, *S.typhimurium*, *S.enteritidis*) — tabelul 31.2.

Tabelul 31.2. Clasificarea antigenică după schema Kauffmann-White a unor salmonele mai frecvent izolate

Numirea serogrupului O		Serovarul	Antigenii O și K	Antigen H	
nouă	veche			faza 1	faza 2
2	A	Paratyphi A	1, 2, 12	a	(1,5)
4	B	Paratyphi B	1, 4, (5), 12	b	1,2
		Agona	1, 4, 12	f, g, s	—
		Typhimurium	1, 4, (5), 12	i	1,2
		Heidelberg	1, 4, (5), 12	r	1,2
7	C ₁	Choleraesuis	6, 7	c	1,5
		Paratyphi C	6, 7 (VI)	c	1,5
8	C ₂ —C ₃	Newport	6, 8, <u>20</u>	e, h	1,2
9	D ₁	Typhi	9, 12 (VI)	d	—
		Enteritidis	<u>1</u> , 9, 12	g, m	(1,7)
3, 10	E ₁	Anatum	3, 10, (15), (15, 34)	e, h	1,6

Simboluri: () — poate fi absent la unele tulpini; factorii O subliniați sunt expresie a conversiei lizogenice.

Antigenul K al salmonelelor se numește Vi (de virulență) și este prezent frecvent la tulpinile serovarului Typhi și ocazional la tulpini de Paratyphi C (tabelul 31.2) și Dublin. Apare și la unele tulpini de *Citrobacter freundii*.

Formula antigenică a unei salmonele are 3 părți în următoarea ordine: descrierea antigenului O, H de fază 1 și H de fază 2 cu virgule între componentele multiple. Prezența antigenului Vi se notează cu «+» sau «-». E. g. Serovarul Typhimurium O:1,4,5,12 H:i:1,2; Typhi O:9,12 H:d Vi⁺.

Uzual, sub raportul patogenității împărțim salmonelele în două grupe:

■ **salmonele tifoidice**, serovarurile Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B și Paratyphi C ale subspeciei *enterica* de *S.enterica*;

■ **salmonele nontifoidice**, restul serovarurilor din toate subspeciile.

31.4.1.3. Habitat

Salmonelele sunt patogeni primari găzduiți în intestinul omului și animalelor, domestice sau sălbatice, de unde pot ajunge în sângele și viscerele vertebratelor. Cele din subspecia *enterica* sunt găzduite mai ales de mamifere. Subspeciile *houtenae*, *arizonae* și *diarizonae* sunt găsite mai ales în intestinul animalelor cu sânge rece și sunt rar patogene pentru om.

Unele serovaruri au remarcabilă specificitate de gazdă: e. g. salmonelele tifoidice pentru om. Salmonelele nontifoidice, în majoritate, au gazde multiple, inclusiv omul.

Contaminează frecvent apa, solul și alimentele. În alimente proteice de origine animală se pot multiplica; în rest numai supraviețuiesc: în apă săptămâni, în sol ani.

31.4.1.4. Factori de patogenitate

O parte din factorii de virulență ai salmonelilor au fost definiți:

- adezivitatea la enterocite le conferă capacitatea de colonizare a intestinului subțire;
- antigenul Vi le conferă capacități antifagocitare și rezistență la efectul bactericid al serului;
- salmonelele tifoidice sunt organisme facultativ intracelulare;
- la salmonele nontifoidice au fost identificați factori de patogenitate codificați plasmidic; un chelator de fier, enterotoxine termolabile, enterotoxină asemănătoare toxinei Shiga etc.;
- endotoxina.

31.4.1.5. Receptivitatea la salmoneloză

Receptivitatea generală la salmonelozele tifoidice apare după ingestia a 10^{5-7} UFC. Gastroenteritele cu salmonele nontifoidice apar numai după ingestia unor doze de 10^{6-8} UFC. La achlorhidrici și la persoane cu disbioze intestinale postantibiotice dozele infectante sunt mult mai mici. Sugarii și imunodeficienții pot face septicemii cu unele salmonele nontifoidice, chiar în lipsa semnelor de infecție intestinală.

31.4.1.6. Salmonelozele

Febrele tifoparatifoidice. Salmonele tifoidice ingerate depășesc bariera gastrică și, pe parcursul perioadei de incubație (7—21 zile), colonizează intestinul subțire, penetrează epiteliul intact și ajung în formațiunile limfoide din corionul mucoasei și în ganglionii limfatici mezenterici, unde se multiplică în citoplasma macrofagelor. Uneori infecția rămâne numai intestinală, inaparentă clinic.

Salmonelele tifoidice antrenate pe cale limfatică generează bacteriemia cu care debutează boala. Salmonelele din sânge sunt captate de sistemul fagocitic mononuclear și își continuă multiplicarea în variate organe (splină, ficat, plămâni, măduvă osoasă etc.).

Aceste noi focare de infecție întrețin și amplifică bacteriemia, generând principalele simptome și semne clinice ale bolii: bronșită difuză, angină, dureri abdominale, splenomegalie, rozeolă tifică (o erupție maculară pe abdomen și baza toracelui, datorată emboliilor limfatice cu bacili tifici). Endotoxemia determină febra (38° — 40°C), starea tifică (gr. *typhos* = stupeoare, încețoșarea sistemului nervos) și leucopenia.

Numărul bacililor tifici din intestin crește până în săptămâna a 3-a a bolii prin adăugarea bacililor eliminați cu bila, începând din săptămâna a 2-a a bolii, la cei eliberați prin ulcerarea plăcilor Peyer. Din săptămâna a 2-a bacilii tifici se elimină și prin urină. O dată cu apariția anticorpilor anti-O, bactericizi, la sfârșitul primei săptămâni de boală, bacilii tifici dispar progresiv din sânge. Fenomene de sensibilizare de tip IV pot determina, în săptămânile 3—4 ale bolii, ulcerarea plăcilor Peyer (hemoragii sau chiar perforații intestinale) și focarele supurative viscerale.

Gastroenterite sau enterocolite sunt expresia clinică a toxiinfecțiilor alimentare salmonelozice.

Septicemiile salmonelozice cu eventuale localizări metastatice sunt determinate la sugari și imunodeficienți de anumite serovaruri de *Salmonella*, mai frecvent *Cholerae suis*.

31.4.2. Investigația etiologică a salmonelozelor

31.4.2.1. Diagnosticul microbiologic

31.4.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează:

- În febrele tifoparatifoidice: hemoculturi și modolocultură pe toată durata febrilă, cu șanse mai mari de izolare în prima săptămână de boală; exsudat din maculele scarificate ale rozeolei; coproculturi pe toată durata bolii; uroculturi (începând din zilele 8—12 de boală); puroi dacă există focare supurative.

Pentru depistarea portajului (convalescenți sau portaj cronic) se prelevă probe de fecale, urină, bilă (fracțiunile B și C ale aspiratului duodenal).

- În toxiinfecții alimentare: materii fecale și probe din alimentul suspectat.
- În septicemii: hemoculturi și puroi din eventuale focare metastatice.

31.4.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă este, în general, fără valoare. Doar în cazul probelor de puroi depistează bacili gramnegativi.

31.4.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapele I și II. Hemoculturile. Se însămânțează în proporție de 1:10 (v/v) sângele prelevat în bulion biliar sau/și bulion peptonat glucozat. Se incubează culturile aerob la 37°C și se examinează microscopic și prin repicări pe mediul Endo în zilele 1; 2; 3; 5; 7 și 10. În caz pozitiv apar colonii lactozonegative, incolore, care trebuie repicate pe mediul Klinger sau Olkenițki, pentru a obține cultura pură stock necesară identificării. Un rezultat negativ poate fi comunicat numai după 10—11 zile de urmărire a hemoculturii.

Medolocultura și rozeocultura. După însămânțare, se procedează ca și pentru hemoculturi.

Coprocultura. Se însămânțează proba de materii fecale într-un mediu de îmbogățire și se epuizează pe câte o placă cu mediu selectiv-diferențial Wilson-Blair (mediul de elecție pentru salmonelele tifoidice) și Ploskirev. Se incubează culturile la 37°C. Mediile de îmbogățire, cum sunt Müller-Kauffmann, bulionul cu selenit acid de sodiu etc., favorizează multiplicarea salmonelelor și inhibă timp de 12—16 ore dezvoltarea bacteriilor intestinale de contaminare.

A doua zi se repică proba îmbogățită pe mediile de izolare și se urmărește în primocultura pe mediile de izolare apariția coloniilor suspecte: colonii lactozonegative pe mediul Ploskirev; colonii negre cu luciu și halou metalic sau colonii verzi-albăstrii pe mediul Wilson-Blair. Se repică mai multe colonii suspecte pe mediile de triaj biochimic (Klinger sau Olkenițki) și pe un mediu diferențial lactozat pentru acumulare de cultură pură necesară identificării.

Urocultura, bilicultura și cultivarea probelor de alimente se realizează, în principiu, după tehnica coproculturii. Se însămânțează sedimentul urinar și al aspiratelor duodenale.

Etapa III. Cultura de *Salmonella* însămânțată pe mediul Olkenițki se manifestă prin: fermentarea glucozei cu gaz (excepție face serovarul Typhi, care nu produce gaz), absența fermentării lactozei și zaharozei, formare de H₂S, absența ureazei.

Identificarea culturilor pure de *Salmonella* se realizează studiind:

■ **Caracterele microscopice:** bacili gramnegativi mobili;

■ **Caracterele biochimice** de gen. **Primare:** creșterea pe mediul cu citrat (Simmons) și pe mediul cu malonat; formarea de H₂S în mediul Klinger sau Olkenițki, testul cu roșu metil pozitiv, testul Voges-Proskauer pentru acetoină negativ, formarea de lizindecarboxilază și absența ureazei și fenilalanindezaminazei. **Secundare:** nu formează indol, nu fermentează lactoza (1 și 4%), zaharoza și salicina; fermentează cu sau fără producere de gaz: glucoza, dulcitolul, xiloza și arabinoza.

■ **Structura antigenică** prin reacții de aglutinare pe lamă cu o baterie de seruri imune absorbite în următoarea succesiune a aglutinărilor:

a) cu ser anti-*Salmonella* polivalent de grup A,B,C,D,E;

b) cu seruri monospecifice de serogrup A (O₂), B (O₄)... și cu ser anti-Vi;

c) cu seruri monospecifice anti-Ha, anti-Hb... pentru stabilirea serovarului (tabelul 31.2).

E. g. dacă în reacția de aglutinare a culturii testate se obține aglutinare cu serul polivalent A—E, cu serul anti-D (O₉), cu serul anti-Hd și cu serul anti-Vi, tulpina izolată are formula antigenică O:9 H:d Vi⁺, adică este serovarul Typhi Vi⁺.

■ **Sensibilitatea la bacteriofagii O** de gen *Salmonella* și de serovar Typhi, Paratyphi A și B. Fagolizotipia tulpinilor Typhi Vi⁺ cu bacteriofagi Vi polivalent și monovalenți se face în scop epidemiologic (stabilirea sursei și căilor de transmitere a infecției).

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele, se apreciază agentul etiologic și se eliberează buletinul de analiză: «Am izolat *Salmonella enterica* serovarul Typhi Vi⁺, biovar 3, lizovar 12».

Diagnosticul de toxiinfecție alimentară este susținut prin izolarea aceluiași serovar de *Salmonella* din alimentul suspect, din fecalele bolnavilor, dar absent în fecalele martorilor.

31.4.2.2. Diagnosticul serologic

În febrele tifoparatifoidice anticorpii apar către a 7-a zi de boală și ating titrul maxim în săptămâna a 4-a. Aglutininele anti-O sunt anticorpi IgM (fără memorie imunologică) și dispar după 2—3 luni de la vindecare; cele anti-H sunt anticorpi inițial IgM, apoi IgG și persistă mai mulți ani după vindecare sau cca 12 luni după vaccinare. Prin reacția de

aglutinare Widal se depistează anticorpii anti-O și cei anti-H, iar prin reacția de hemaglutinare indirectă (RHAI) anticorpii anti-O.

Mai accesibilă este reacția Widal, care se face separat cu antigenii O (suspensii de salmonele omorâte prin alcoolare) și H (suspensii omorâte prin formolare) ai serovarurilor Typhi, Paratyphi A și Paratyphi B. Pentru aceasta se pregătește o serie de 6 diluții din serul bolnavului în soluție salină izotonă (revedi figura 11.8). Titruri aglutinante anti-O de 1:200 sunt sugestive pentru diagnostic, iar cele de 1:800 sunt de certitudine. Antibioticoterapia deprimă anticorpogeneza în primele săptămâni de boală. De aceea, în aceste cazuri, ca și în cazul unor titruri dubioase, este indicată reacția Widal în dinamică pe două probe de ser prelevate la interval de 7—10 zile. Creșterea de cel puțin 4 ori a titrului anticorpilor în a 2-a probă de ser are semnificație clinică.

Aglutininele anti-Vi sunt frecvent prezente la purtătorii cronici ai serovarului Typhi. Titruri de 1:10 sunt sugestive, iar de 1:40 sunt concludente.

31.4.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul și profilaxia febrei tifosice

- Ser imun aglutinant anti-*Salmonella* polivalent de grup A—E.
- Seruri imune aglutinante anti-*Salmonella* polivalente pentru grupurile rar întâlnite.
- Seruri imune anti-O monospecifice de grup.
- Seruri imune anti-H monospecifice de fază 1 și 2.
- Suspensii alcoolate (antigen O) și formolate (antigen H) ale serovarurilor Typhi, Paratyphi A și B pentru reacția Widal.
- Suspensii de eritrocite sensibilizate cu antigeni *Salmonella* de serogrup pentru RHAI.
- Bacteriofag O de gen *Salmonella*.
- Set de bacteriofagi antiserovaruri Typhi, Paratyphi A și B.
- Set de bacteriofagi Vi anti-Typhi.
- Suspensii de bacteriofagi antitifosici pentru fagoterapie și fagoprofilaxie.
- Vaccin antitifosic.

31.5. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE ENTEROBACTERII CONDITIONAT PATOGENE

31.5.1. Date generale

Din familia *Enterobacteriaceae*, în afară de *Echerichia*, mai multe genuri fac parte din microbiocenoza intestinală a omului și animalelor: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*. Între 1 și 5% din persoanele normale elimină cu fecalele una sau mai multe din numeroasele specii ale acestor genuri în cantități de până la 10^3 UFC/g, mai rar 10^{4-5} UFC/g. Specii de *Klebsiella* se izolează

ocazional din căile respiratorii superioare. Toate contaminează apa, solul, alimentele și variate suprafețe din mediul comunal, domiciliu și de spital.

Aceste bacterii comensale sunt organisme oportuniste inzestrate cu unii *factori de patogenitate* prin care pot iniția infecții la gazde cu deficiențe ale apărării antiinfecțioase locale sau sistemice. Frecvent sunt multirezistente la antibiotice.

Factorii de patogenitate ai enterobacteriilor condiționat patogene pot fi: factori de adezivitate și colonizare, enzime proteolitice, factori invazivi, capsulă cu efecte antifagocitare, hemolizine, enterotoxine, endotoxină etc.

În ultimele 2—3 decenii enterobacteriaceele condiționat patogene au o pondere evidentă în etiologia infecțiilor de spital endogene sau exogene explicată prin:

- *concentrațiile mari* pe care le realizează în *fondul microbian de spital* (eliminarea prin fecale, produse patologice; capacitatea de a se multiplica, chiar la temperatura camerei, în medii umede minimale nutritiv);

- *deficiențele apărării antiinfecțioase ale pacienților spitalizați* create prin bolile de fond, intervenții chirurgicale, manopere endoscopice și de terapie intensivă-reaminare, antibioticoterapie prelungită, terapie imunodepresivă sau imunosupresivă, copii născuți prematur, distrofici etc.

Infecțiile determinate: supurația plăgilor, abcese, flegmoane, sinuzite, bronhopneumonii, peritonite secundare, septicemii, meningite, șoc toxic bacterian, cistite, pielonefrite, enterite, mai ales la copii, toxinfecții alimentare.

31.5.2. Investigația etiologică a infecțiilor cu enterobacterii condiționat patogene

Diagnosticul bacteriologic corect al acestor infecții cu identificarea până la nivel de categorie microscopică sau gen și efectuarea antibiogramei sunt esențiale pentru decizia clinică, iar identificarea până la nivel de specie, serovar, biovar, eventual lizovar are valoare epidemiologică.

Prelevatele patologice examinate depind de forma clinică și localizarea infecției: puroi, exsudate, spută, aspirat bronșic, lichid cefalorahidian, sânge, urină, fecale, alimente. Prelevarea corectă are loc decisiv în interpretarea rezultatelor examinării (revedi partea întâi, capitolul 3).

Microscopia frotiurilor colorate Gram din prelevatele patologice (cu excepția materiilor fecale) este orientativă. Depistează în puroi, lichid cefalorahidian, urină etc. bacili gramnegativi asociați celulelor inflamatorii într-un anumit număr pe câmpul microscopic. Depistarea de bacili gramnegativi capsulați sugerează *Klebsiella*.

Izolarea și identificarea. Izolarea cantitativă sau semicantitativă și identificarea genului, speciei și markerilor epidemiologici se efectuează pe mediile clasice pentru enterobacteriacee cu studiul caracterelor microscopice, de cultivare, activității biochimice, structurii antigenice (specie, serogrup, serovar), factorilor de patogenitate (enterotoxigeneză etc.), antibiogramei.

Genul *Klebsiella*, cu speciile de interes medical *K.pneumoniae* și *K.oxytoca*, reunește bacili gramnegativi, imobili, capsulați, care formează colonii mucoide, mai frecvent lactozopozitive. Caracterele biochimice cheie pentru identificare sunt: capacitatea de a utiliza citratul și malonatul de sodiu, de a fermenta adonitolul și inozitolul, de a produce urează și lizindecarboxilază. Reacția cu roșu de metil este negativă, iar reacția Voges-Proskauer

(producerea de acetoină) pozitivă, dar unele izolate din căile respiratorii pot da reacții atipice. Nu produc H_2S și fenilalanindezaminază. *K. oxytoca* produce indol. După antigenii capsulari identificăm 80 serovaruri.

Speciile de *Klebsiella* sunt implicate în infecții cu forme clinice grave: pneumonii și a. cu tendință de generalizare de tip toxicosepticemic.

Genul *Enterobacter*, cu speciile *E. aerogenes*, *E. cloacae* și a., are caractere asemănătoare cu *Klebsiella*, dar sunt bacili mobili. Are 53 antigeni O de serogrup și 57 antigeni H de serovar.

Genul *Serratia*, cu speciile *S. marcescens*, *S. liquefaciens* etc., se distinge prin producere de acetoină, lichefierea rapidă a gelatinei, producerea de lipază, lecitinază, ADN-ază; unele tulpini produc un pigment roșu nedifuzabil. Produce forme grave de infecții toxicosepticemice cu șoc endotoxinic.

Genul *Proteus*, cu speciile *P. vulgaris* și *P. mirabilis*, invadează suprafața mediilor solide cu un văl de cultură. Produc urează, fenilalanindezaminază și H_2S . Dau reacția cu roșu metil pozitivă și reacția Voges-Proskauer negativă. Nu fermentează lactoza și nu utilizează malonatul. *P. vulgaris* produce indol.

Genurile *Morganella* (*M. morganii*) și *Providencia* (*P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* și a.) produc fenilalanindezaminază și indol, dar variabil urează. Nu produc H_2S . Dau reacția cu roșu metil pozitivă și Voges-Proskauer negativă. Nu fermentează lactoza și nu utilizează malonatul. *Providencia* utilizează citratul de sodiu, dar *Morganella* nu. Pe medii solide nu cultivă invaziv.

Criteriile de semnificație clinică a enterobacteriilor condiționat patogene izolate din prelevate normal contaminate (spută, puroi din plăgi sau fistule, urină, fecale, alimente) sunt:

- izolarea unei anumite specii în cantitate mai mare de 10^5 UFC/ml sau g de prelevat patologic;
- depistarea repetată în aceste cantități a aceleiași specii;
- autoserodiagnosticul: creșterea de cel puțin 4 ori în cursul bolii acute a anticorpilor serici față de tulpina suspectă izolată de la pacient.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI ȘI ALTOR DIAREI VIBRIOGENE

Holera este o toxiinfecție intestinală acută, contagioasă, cauzată de vibrionii holerigeni și manifestată clinic prin diaree apoasă, cu deshidratare masivă, colaps algid și mortalitate mare în lipsa tratamentului patogenetic.

32.1. DATE GENERALE

32.1.1. O minidefiniție

Genul *Vibrio* reunește bacili gramnegativi, incurbați în virgulă, mobili prin flageli polari (cele mai multe specii fiind monotriche), nesporulați. Oxodazopozitivi și catalazopozitivi. Aerobi sau facultativ anaerobi. Nepretențioși nutritiv, creșterea fiind stimulată prin clorura de sodiu (unele specii sunt halofile). Atacă zaharurile fermentativ fără producere de gaz (exceptând puține specii). Formează indol, reduc nitrații în nitriți. Nu hidrolizează arginina.

32.1.2. Repere taxonomice

Familia *Vibrionaceae* reunește bacterii acvatice clasificate în patru genuri, dintre care interes medical prezintă numai trei: *Vibrio*, *Aeromonas* și *Plesionomas*.

În genul *Vibrio* există specii diareigene pentru om și specii avirulente, care trăiesc libere (*free life*). Vibrionii diareigeni aparțin, în majoritate, speciei *V.cholerae*, care are numeroase serogrupe O: O1—O139. În raport cu gravitatea bolii și cu particularitățile epidemiologice deosebim:

■ *Vibrionii holerigeni*: *V.cholerae* O1 și *vibrio* O139 Bengal. *V.cholerae* O1 are două biovariante (clasică și El Tor) fiecare cu trei serovaruri comune (Ogawa, Inaba și Hykojima). Capacitatea holerigenă a serogrupului O139 a fost descoperită cu ocazia epidemiei de îmbolnăviri grave asemănătoare holerei din 1992—1993. Biovarurile holerigene se diferențiază prin caracterele biologice și biochimice prezentate în tabelul 32.1.

Tabelul 32.1. Caractere distinctive ale biovarurilor de vibrioni holerigeni

Caractere	Clasic	El Tor	Bengal
Serogrupul	O:1	O:1	O:139
Grupul fermentativ Heiberg-Smith ¹	I	I	I
Hemoliza eritrocitelor de oaie	—	+	v
Hemaglutinarea eritrocitelor de găină	—	+	+
Sensibilitatea la polimixină B	S	R	R
Reacția Voges-Proskauer	— ²	+	+
Liza prin fagul IV	+	—	—
Liza prin fagul 5	—	+	...

Simboluri: «+» — 90% din tulpini pozitive; «—» — 90% din tulpini negative; v — variabil cu tulpina; S — sensibil; R — rezistent; ... — lipsa informațiilor.

¹ În funcție de fermentarea manozei, zaharozei și arabinozei, vibrionii sunt împărțiți în 8 grupe fermentative (I—VIII). Grupul I, al vibrionilor holerigeni este manoză +, zaharoză +, arabinoză —.

² Doar 25% din tulpini sunt slab pozitive.

■ *Vibrionii non-O1, neholerigeni* (O2—O138) determină boală diareică benignă manifestată uneori ca izbucniri de toxiinfecții alimentare.

■ *Vibrionii halofili* (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*) cauzează toxiinfecții alimentare.

Aeromonas hydrophila și *Plesiomonas shigelloides* cauzează, ocazional, diaree la om.

32.1.3. Habitat

Vibrionii holerigeni sunt găzduiți în intestinul omului. Purtătorii sănătoși de lungă durată sunt excepționali. Există însă un ciclu extraintestinal al acestor vibrioni, care implică microzooplanctonul și crustaceele din apele de lac sau estuarine din zonele temperate, tropicale sau ecuatoriale. Acest ciclu extraintestinal favorizează implantarea endemică a holerei în asemenea regiuni litorale.

Vibrionii non-O1 sunt organisme cosmopolite ale mediului acvatic, prezența lor în intestinul animalelor acvatice (pești, broaște, păsări etc.) fiind frecventă, iar în intestinul uman numai incidentală.

Vibrionii halofili trăiesc în apele costiere, estuarine și lagune (nu au fost găsiți în largul mării), unde sunt izolați din sedimente, zooplancton, pești, moluște, crustacee. În zonele temperate se izolează în special vara și toamna, în cele tropicale mai ales în sezonul uscat, când crește salinitatea apelor care îi găzduiesc.

32.1.4. Factori de patogenitate

Vibrionii holerigeni posedă un echipament enzimatic (*mucinază*, *neuraminidază* etc.) care le deschide calea spre enterocitele de care aderă prin *liganzi* încă neprecizați și *colonizează masiv intestinul subțire* (cca 2 miliarde vibrioni/ml de conținut intestinal). Determinantă în apariția bolii este *toxina holerică*, o enterotoxină termolabilă care ac-

tivează adenilatciclaza din membrana enterocitelor și determină un transfer hidroelectrolitic masiv din plasmă în intestin.

Vibrionii non-O1 cauzează diaree prin *enterotoxine termostabile*, iar cei *halofili* printr-un mecanism mai complex, care, pe lângă *enterotoxine termolabile* sau *termostabile*, implică și *hemolizine*.

32.1.5. Receptivitatea la holera

Doza infectantă de vibrioni holerigeni este enormă, de ordinul a 10^9 vibrioni, dar scade mult, chiar până la 10^{3-5} , la persoanele cu hipo- sau anaciditate gastrică ori când sunt vehiculați de alimente care conțin chitină, prin care vibrionii sunt protejați de aciditatea gastrică.

32.1.6. Infecțiile determinate de vibrioni

Holera se manifestă ca o diaree acută fără febră, fără dureri abdominale, fără toxemie sistemică și fără inflamația mucoasei intestinale. Scaunul fluid conține numeroase flocoane riziforme rezultate din mucusul intestinal sub acțiunea mucinazei vibriunilor holerici. Pierderea hidroelectrolitică prin scaun și vărsături determină hipotensiune accentuată, slăbiciune extremă, apatie, prostrație și hipotermie (colaps algid). Moartea survine prin șoc hipovolemic cu acidoză metabolică și azotemie crescută.

Sindroamele diareice determinate de vibrionii non-O1 sunt benigne.

În afară de diaree, vibrionii halofili pot determina infecții ale plăgilor, iar la gazda compromisă (e. g. pacienți cu insuficiență hepatică) *septicemii* sau *meningite*. Cele mai grave asemenea infecții le determină *V. vulnificus* (de la lat. *vulnificus* = a cauza răni), dar au fost implicate și alte specii ca *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis* etc.

32.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HOLEREI

32.2.1. Diagnosticul microbiologic

32.2.1.1. Prelevate patologice

De la bolnavi se examinează scaunul diareic și vărsăturile. Pentru depistarea portajului este indicată prelevarea din scaunul obținut după administrarea unui purgativ salin sau a aspiratului duodenal (fracțiunea B — bila vezicală). De la cadavre se prelevă trei porțiuni din intestinul subțire secționat între duble ligaturi, pentru a reține integral conținutul, și vezicula biliară în întregime.

Din mediul ambiant se recoltează probe de apă, moluște, crustacee, intestinul peștilor etc.

Mediile de transport indicate sunt: apă peptonată alcalină (pH 8,6) sau mediul Carry-Blair.

Prelevarea, ambalarea și transportul probelor la laborator se vor face cu maxime precauții, pentru a preveni răspândirea infecției prin contaminarea personalului și mediului.

32.2.1.2. Metoda rapidă de diagnostic

Astfel de metodă se bazează pe microscopie. Este indicată în formele tipice de boală și permite depistarea vibriunilor holerice în scaunul apos cu aspectul fierturii de orez sau în lichidul de vărsătură în interval de 1—2 ore. Include următoarele tehnici de examinare a prelevatelor recente:

a) *Frotiul colorat Gram*, care depistează, în absența reacției inflamatorii, numeroși bacili încurbați gramnegativi.

b) *Preparatul între lamă și lamelă* depistează numeroși vibrioni foarte mobili.

c) *Colorația imunofluorescentă directă* cu ser anti-O1 depistează și identifică vibriunii holerigeni rapid, cu mare sensibilitate (depistează și 10^{3-4} vibrioni/ml) și specificitate.

d) *Reacția de microaglutinare și imobilizare a vibriunilor*. Pe o lamă de microscop se depun, la distanță una de alta, două picături din prelevatul patologic. Într-una se depune o picătură de ser antiholeric O1, iar în cealaltă o picătură de soluție salină izotonă. După 1—2 minute de omogenizare atentă, se acoperă fiecare picătură cu câte o lamelă și se examinează la microscopul cu fond negru sau cu contrast de fază. În picătura martor se observă bacili foarte mobili; în picătura test vibriunii sunt imobilizați și aglutinați în flocoane.

e) *Reacția de imobilizare a vibriunilor sub acțiunea bacteriofagilor antiholerici «C» (clasic) și «ET» (El Tor)*. În două picături separate din materialul de examinat se omogenizează o ansă din suspensia fagică «C», respectiv «ET». Se acoperă picăturile cu câte o lamelă și, după 3—5 minute, se examinează preparatul la microscop. Picătura în care vibriunii vor fi imobilizați indică biovarul vibriunului holerice depistat.

Deci, în cazuri tipice de holeră cu concentrații mari ale vibriunilor în prelevatele examinate, metoda rapidă descrisă permite depistarea agentului cauzal (vibriuni gram-negativi, tipic mobili, aglutinați și imobilizați de serul antiholeric O1) și identificarea biovarului prin sensibilitatea la bacteriofagii antiholerici *clasic* sau *El Tor*. Metoda rapidă este orientativă și rezultatele ei trebuie confirmate prin izolarea și identificarea culturilor pure.

32.2.1.3. Izolarea și identificarea

Se efectuează în etape de 6—12 sau 18—24 ore cu utilizarea mediilor electiv de îmbogățire (e. g. apă peptonată cu pH 8,6—9,0) și a mediilor selectiv-diferențiale slab selective (e. g. BSA — bile-salt-agar) sau moderat selective (e. g. TCBS — tiosulfat-citrat-bilă-sucroză) pentru izolarea vibriunilor în cultură pură.

Etapa I. Se însămânțează proba de examinat pe prima apă peptonată alcalină (APA) în raport de 1:5—1:10 (v/v) și, totodată, se epuizează pe o placă cu mediu diferențial-selectiv.

După 6 ore de incubare la 37°C în APA apare opalescență, mai mult sau mai puțin intensă, și un văl la suprafață. Prin tehnicile de examinare rapidă se determină cantitativ prezența vibriunilor și biovarul lor.

Etapa II. Se repică o ansă din vălul dezvoltat pe APA I într-un tub cu APA II și pe o placă cu mediu diferențial-selectiv, și se incubează la 37°C alte 6—12 ore. Astfel după 24 ore de la începutul examinării:

■ se urmărește și se identifică prezumtiv prin metoda rapidă vibriunii din tubul cu APA II și din coloniile sugestive apărute pe mediul diferențial selectiv: colonii S sau S—R, rotunde, ușor bombate, fin granulare, transparente cu nuanță albastruie la iluminarea

directă, opace după 24 ore, cu reacția oxidazei pozitivă (testare pe bandă de hârtie imbibată cu tetrametil-*para*-fenilendiamină);

■ se repică 2—3 colonii sugestive pe pantă de geloză cu lactoză și zaharoză, și indicator de pH, pentru a obține cultura pură stock necesară identificării definitive.

Etapa III. Izolatele lactozonegative care fermentează zaharoza sunt supuse identificării conform următoarelor teste minimale posibile în laboratoarele din teren:

a) *microscopia pe frotiu colorat Gram*, pentru a determina morfologia vibriunilor și puritatea culturii;

b) *microscopia între lamă și lamelă* la microscopul cu fond întunecat sau cu contrast de fază, pentru a observa mobilitatea;

c) *reacția de aglutinare pe lamă și în tuburi* cu serurile imune antiholerice O1, RO, Ogawa, Inaba, O139 și serurile O2—O138, pentru identificarea rapidă a serogrupului (holeră sau simplă diaree vibriogenă);

d) *sensibilitatea culturii la bacteriofagii antiholerici «C» și «ET» determinată pe placă cu geloză nutritivă* identifică biovarurile vibriunilor holerigeni;

e) *biochimice*: fermentarea manozei, arabinozei și zaharozei pentru determinarea grupului fermentativ Heiberg (vibriunii holerigeni aparțin grupului fermentativ I manoză +, zaharoză +, arabinoză —), decarboxilarea lizinei și ornitinei și lipsa arginindehidrolazei confirmă genul *Vibrio*.

Laboratoarele Centrului Republican de Referință izolează și identifică vibriunii de la bolnavi, de la purtători sau din mediul ambiant, confirmă identitatea tulpinilor izolate în laboratoarele din teren și aprofundează studiul lor prin teste de patogenitate: depistarea enterotoxinei holerice (e. g. testul ansei ileale izolate de iepure), adezivității, enzimelor de patogenitate, lizotipie, efectuează antibiograma.

În practica de laborator culturile de *Vibrio* trebuie diferențiate corect de genurile familiilor *Enterobacteriaceae* și *Pseudomonadaceae*.

Depistarea purtătorilor de vibrioni holerigeni se face prin izolarea și identificarea culturilor pure obținute din probele de scaun sau aspirat duodenal (revedi 34.2.1.1).

În focarele epidemice de holeră se practică *metoda rapidă de depistare în masă a purtătorilor de vibrioni*. De la grupuri de 10 persoane se prelevă câte un tampon rectal, care se însămânțează, pe rând, într-un flacon cu 100—200 ml apă peptonată alcalină, care conține ser antiholeric O1 aglutinat în titru activ. Reacția pozitivă de acumulare și aglutinare a vibriunilor după 4—8 ore de incubare la 37°C este urmată de investigații individuale, separate.

Prezența vibriunilor holerigeni în probele de apă se urmărește prin însămânțarea directă a probei de apă în proporție de 10% în APA concentrată de 5 ori (e. g. 20 ml apă în 200 ml mediu concentrat) sau prin tehnica reacției de aglutinare în APA cu ser antiholeric O1, când după 6—8 ore de incubare la 37°C se urmărește apariția flocoanelor de aglutinare, din care se izolează cultura pură.

32.2.2. Diagnosticul serologic

Are numai semnificație retrospectivă și orientativă pentru investigarea stării de purtător sănătos. Sunt indicate: reacția de aglutinare și reacția anticorpilor vibriocizi.

Titul diagnostic semnificativ pentru holeră al anticorpilor aglutinanți este de 1:80; mai multă bază se pune pe creșterea de cel puțin 4 ori a titrului anticorpilor în probe de ser recoltate în dinamică, la intervale de 6—8 zile.

Titrul diagnostic al anticorpilor vibriocizi (serul bolnavului + vibrioni holerigeni în cultură vie + complement) la bolnavi este de 10^{-5} — 10^{-6} , iar la purtătorii sănătoși de durată rămâne stabil între 10^{-3} și 10^{-5} .

32.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și profilaxia holerei

- Seruri antiholerice aglutinante O1—O139.
- Ser antiholeric O1 marcat fluorescent.
- Ser antiholeric O1 Inaba și Ogawa.
- Bacteriofagii antiholerici «C» și «ET».
- Vaccin antiholeric corpuscular inactivat.
- Vaccin holerogen — anatoxină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE CAMPILOBACTERII ȘI HELICOBACTERII

33.1. DATE GENERALE

33.1.1. O minidefiniție

Genurile *Campylobacter* și *Helicobacter* includ bacili gramnegativi incurbați sau spiralați, care în condiții de mediu nefavorabile se pot transforma în forme cocoide cu viabilitate redusă, mobili datorită unor flageli cu dispoziție polară. Microaerofili, oxidazopozitivi, azaharolitici.

33.1.2. Reper taxonomic

Caracterele comune descrise au determinat includerea respectivelor bacterii într-un singur gen, *Campylobacter* (de la gr. *capylo* = incurbat). Mai recent studii de taxonomie moleculară au pledat pentru crearea celui de al doilea gen, *Helicobacter*.

În genul *Campylobacter* sunt încadrate în prezent 11 specii cu 7 subspecii sau biovaruri (tabelul 33.1).

Tabelul 33.1. Specii incluse în genurile *Campylobacter* și *Helicobacter*

<i>Campylobacter</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	<i>H. pylori</i>
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	<i>H. heilmanii</i>
<i>C. coli</i>	<i>H. cinaedi</i>
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	<i>H. fennelliae</i>
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	<i>H. mustelae</i>
<i>C. hyointestinalis</i>	<i>H. felis</i>
<i>C. sputorum</i> (trei biovaruri)	<i>H. muridarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>H. hepaticus</i>
<i>C. concisus</i>	<i>H. canis</i>
<i>C. mucosalis</i>	<i>H. nemestrinae</i>
<i>C. curvus</i>	<i>H. acinomyx</i>

<i>Campylobacter</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>C.rectus</i>	
<i>C.upsaliensis</i>	

După cele mai recente date, din genul *Helicobacter* fac parte 11 specii (tabelul 33.1), tulpini de *Helicobacter* izolate de la păsări neprimind încă denumire binominală.

33.1.3. Habitat

Reprezentanții celor două genuri sunt adaptați a habita stratul de mucus juxtaepitelial.

Majoritatea speciilor de *Campylobacter* sunt comensale ale mucoasei bucale, intestinale sau genitale la om, animale sau păsări. *C.jejuni* subspecia *jejuni* și *C.coli*, având drept rezervor natural păsări și animale domestice, pot determina enterocolite acute la om. *C.fetus* subspecia *fetus*, care cauzează avort la vite și oi, se comportă la om ca un condiționat patogen, fiind implicat, la imunodepresaji, in infecții bacteriemice cu localizări secundare (meningite, endocardite, artrite).

Speciile *Helicobacter* au nișe ecologice mult mai restrictive, frecvent cu specificitate de specie animală, fiind prezente pe mucoasa gastrică sau intestinală. La om sunt întâlnite primele patru specii din cele menționate în tabelul 33.1. Prezența *H.pylori* și *H.heilmanii* cu predilecție la nivelul mucoasei antrale se însoțește întotdeauna de leziuni microscopice de tip inflamator (gastrita tip B), *H.pylori* fiind implicate printre alți factori în etiopatogenia bolii ulceroase, adenocarcinomului gastric și limfomului gastric cu celule B. *H.cinaedi* și *H.fennelliae* determină diaree cu leziuni de proctită mai ales la homosexuali.

33.1.4. Factori de patogenitate

C.jejuni subspecia *jejuni* și *C.coli* sunt considerate bacterii enterotoxigene și enteroinvazive. Aceste specii produc două tipuri de citotoxine și o enterotoxină similară toxinei holerice și enterotoxinei termolabile a *E.coli*, care acționează la nivelul jejunului și ileonului, și sunt responsabile de diaree apoasă. Mecanismul enteroinvaziv este de tip *Shigella* și se însoțește de leziuni ulcerative pe mucoasa colonului, cu prezența polimorfonuclearelor în probele de scaun; uneori sunt posibile bacteriemii pasagere. Spre deosebire de aceste specii, *C.fetus* subspecia *fetus*, protejat de o proteină de înveliș (proteina S), rezistă la efectul bactericid mediat prin complement și anticorpilor serici.

H.pylori reușește să colonizeze mucoasa gastrică prin producere de urează în cantitate mare (care prin ionii rezultați din descompunerea ureei tamponază pH-ul acid gastric) și grație formei și mobilității lor traversează stratul de mucus și se fixează la receptori specifici de pe suprafața celulelor epitelului gastric. Efectul citopatic local este determinat de o citotoxină produsă de aproximativ 50% din tulpini, agravat prin acțiunea combinată a ureazei.

33.1.5. Receptivitatea la infecții

Receptivitatea omului la infecția cu *C.jejuni/coli* este generală. Pacienții expuși contaminării orale cu un număr mare de bacterii sau cei cu hipoaciditate gastrică fac în special infecții manifeste clinic.

Colonizarea mucoasei gastrice cu *H. pylori* poate surveni la orice vârstă. În țările în curs de dezvoltare este remarcată o frecvență importantă a infecției la copii, care continuă să crească la tineri și adulți la niveluri mai superioare celor observate în țările dezvoltate.

33.1.6. Infecții umane determinate de specii

Campylobacter și Helicobacter

33.1.6.1. Enterocolita cu *C. jejuni/coli*

Survine mai ales la copii după consum de preparate din carne, lapte sau de apă contaminate, mai rar prin contact direct cu animale sau persoane bolnave ori purtători. De menționat că aceste specii figurează printre agenții etiologici ai «diareei voiajorilor».

Expresia clinică este variabilă: după o incubajie de 2—5 zile apar febră, dureri abdominale colicative asociate sau urmate de scaune apoase cu mucus, care pot deveni sangvinolente sau mucopurulente. Aceste infecții au frecvent o evoluție spontan favorabilă, dar sunt cazuri la care manifestările digestive durează peste o săptămână sau pot evolua cu recăderi, ceea ce impune tratament cu un antibiotic activ (de predilecție eritromicina). Foarte rar sunt descrise complicații de tip hemoragii intestinale, artrite reactive, sindrom hemoliticuremic.

33.1.6.2. Gastrita cu *H. pylori*

În prezent este unanim admis că *H. pylori* este agentul etiologic al gastritei antrale de tip B. Infecția este strict umană, fiind suspectată ca mecanism de transmitere calea oral-orală sau fecal-orală. Marea majoritate a cazurilor sunt asimptomatice, implicarea *H. pylori* în dispepsia neulceroasă fiind controversată.

Larg dezbătut este rolul jucat de *H. pylori* în apariția ulcerului duodenal, în prezent considerându-se că această bacterie este agentul cel mai important în boala multifactorială care este ulcerul peptic. Eradicarea *H. pylori* înseamnă rezolvarea gastritei, precondiția de bază a ulcerului.

În ultimii ani s-au adus o serie de argumente pentru implicarea *H. pylori* în apariția adenocarcinomului gastric. Supoziții logice privind mecanismele patogenetice (gastrită cu *H. pylori* → gastrită atrofică → metaplazie intestinală → displazie → adenocarcinom) nu au putut fi susținute încă prin probe concludente. În schimb există argumente experimentale și terapeutice ale unei relații cauzale între gastrita cu *H. pylori* și limfomul gastric cu celule B.

33.2. DIAGNOSTICUL ETIOLOGIC AL ENTEROCOLITEI CU *C. JEJUNI* ȘI *C. COLI*

33.2.1. Diagnosticul bacteriologic

33.2.1.1. Prelevate patologice

Intrucât manifestările clinice sunt necaracteristice, diagnosticul etiologic poate fi stabilit numai prin examinarea probelor de scaun (2—3 probe) transportate și conservate în coprocultor cu mediu Cary-Blair.

În rare cazuri se poate recurge la hemoculturi.

33.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă constituie o metodă rapidă de evidențiere a *C.jejuni/coli* în probele coprologice, prin reperarea acestor bacterii, după morfologia caracteristică, în frotiu colorat cu albastru de metilen; frecvent pot fi prezente polimorfonucleare și hematii.

33.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Însămânțarea pe medii de cultură bogat nutritive (geloză Columbia, geloză-*Brucella* sau geloză-tripticăză-soia adăugată cu sânge de cal sau berbec) și inhibante pentru restul florei intestinale (medii selective prin adaos de antibiotice: vancomicină + trimetoprim + polimixină) cu incubare timp de 24—48 ore în condiții microaerofile (O_2 5% + CO_2 10% + N_2 85%) la temperatura de 42—43°C constituie o metodă sensibilă de depistare a *C.jejuni/coli* în probele de scaun. În condițiile în care nu dispunem de plicuri cu generator chimic pentru realizarea microaerofiliei într-o incintă etanșă, se poate recurge la procedeul cu lumânare, cu mențiunea că unele tulpini mai exigente pot să nu cultive.

Etapa II. Coloniile de *C.jejuni/coli* de mărimi variabile, plate, transparente, care uneori se întind de-a lungul urmei lăstate de ansă se deosebesc după aspect de coloniile eventualelor contaminanți neinhibaji pe medii selective; ele sunt repicate pentru a obține culturi pure necesare identificării.

Etapa III (tabelul 33.2):

Tabelul 33.2. Teste folosite pentru identificarea speciilor *Campylobacter* și *Helicobacter* cu interes uman

Teste	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	<i>H.pylori</i>	<i>H.cinaedi</i>	<i>H.fennelliae</i>
Creștere la							
■ 25°C	—	—	—	+	—	—	—
■ 37°C	+	+	+	+	+	+	+
■ 42°C	+	+	+	±	—	—	—
Oxidaza	+	+	+	+	+	+	+
Catalaza	+	+	+	+	+	+	+
Ureaza	—	—	—	—	+	—	—
Nitratreductaza	+	+	+	+	—	+	—
Hidroliza hipuratului	+	—	—	—	—	—	—
Sensibilitatea la							
■ acid nalidixic	S	S	R	R	R	S	S
■ cefalotină	R	R	S	S	S	S	S
Abrevieri: S — sensibil; R — rezistent.							

■ Identificarea preliminară se bazează pe criterii care permit încadrarea tulpinii izolate în categoria speciilor termofile de *Campylobacter*: condițiile optime de cultivare, aspectul macroscopic și microscopic al coloniilor, testul catalazei și oxidazei pozitive.

■ Testarea sensibilității față de rundele cu acid nalidixic și cefalotină permit diferențierea *C.jejuni/coli* de alte specii termofile: *C.jejuni/coli* sunt sensibile la acid nalidixic, dar rezistente la cefalotină, *C.lari* având un comportament diferit.

- Identificarea ca specie a tulpinii izolate se poate face prin testul hidrolizei hipuratului, pozitiv numai pentru *C.jejuni*.

- Identificarea serologică pe baza antigenilor termostabili lipopolizaharidici (schema Penner) sau a antigenilor proteici flagelari sau de suprafață (schema Lior) ca și biotiparea și tiparea fagică servesc numai pentru studii epidemiologice.

33.2.2. Diagnosticul serologic

Consecutiv infecției cu *C.jejuni/coli* în organism apar anticorpi specifici: IgA și IgM în primele 10 zile de la debutul manifestărilor de enterocolită acută, apoi IgG cu persistență de mai multe săptămâni sau luni.

Reacții de tip aglutinare, hemaglutinare pasivă, precipitare, imunofluorescență indirectă, fixare de complement, ELISA folosind ca antigeni suspensii de celule bacteriene intacte sau dezintegrate prin sonicare pot fi utilizate în studii seroepidemiologice.

33.3. DIAGNOSTICUL GASTRITEI CU *H. PYLORI*

33.3.1. Metode invazive

Metodele invazive aduc dovada infecției cu *H.pylori* prin examinarea fragmentelor de mucoasă gastrică prelevate în cursul examenului endoscopic.

33.3.1.1. Recoltarea fragmentelor de mucoasă gastrică

H.pylori are o repartiție neuniformă la nivelul mucoasei gastrice, zona optimă pentru prelevarea cu ajutorul forcepsului endoscopului situându-se la aproximativ 2 cm distanță de pilor. Cercetarea bacteriei în suc gastric dă rezultate mai puțin performante.

Sunt necesare minimum patru fragmente de mucoasă gastrică:

- un fragment va fi plasat într-o soluție cu uree și indicat de pH, pentru evidențierea urezei preformate;

- alte două fragmente destinate examenului microscopic și culturii vor fi depuse într-un flacon cu soluție hipertona de glucoză, pentru a împiedica desicarea probei și detașarea stratului de mucus; probele sunt conservate la +4°C pe maximum 4 ore până la momentul examinării;

- un fragment este destinat examenului histopatologic fiind depus într-o soluție fixatoare (formol sau fixator Bouin).

33.3.1.2. Teste rapide de diagnostic

- *Testul urezei:* *H.pylori* produce o cantitate atât de importantă de urează, încât aceasta poate fi detectată direct în produsul de biopsie; dacă *H.pylori* este prezent, pH-ul alcalin rezultat din hidroliza ureei va schimba culoarea indicatorului într-un interval de 30 minute — 4 ore.

- *Microscopia directă* permite identificarea *H.pylori* după aspectul morfologic fie în frotiu colorat cu fucsină Gram, fie în secțiuni histologice colorate Giemsa lent. Utilizarea unui ser monoclonal în testul de imunofluorescență directă permite identificarea corectă a speciei, atât a formelor tipice, cât și atipice (forme cocoide).

33.3.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Triturat din biopsia gastrică este însămănțat pe medii de cultură care servesc izolării *C.jejuni/coli*. Se preferă însămănțarea concomitentă pe medii neselective și selective cu antibiotice (vancomicină + trimetoprim + cefsulodină). Incorporarea de trifeniltetrazoliuclorid în mediu permite recunoașterea cu ușurință a coloniilor de *H.pylori*.

Incubarea plăcilor se face la temperatura de 37°C în condiții de microaerofilie, timp de 7 zile.

Etapa II. Coloniile suspecte de *H.pylori* sunt de tip S, cu diametrul de aproximativ 1 mm și apar după minimum 3 zile de la însămănțare; pe medii cu trifeniltetrazoliuclorid coloniile apar de culoare galbenă. Acestea sunt repicate, pentru a obține cultura pură necesară identificării speciei.

Etapa III. În plus de caracterele de cultivare, identificarea unei culturi de *H.pylori* se bazează pe:

- **critériul microscopiei:** bacili relativ lungi, drepți sau cu aspect ondulat, în formă de «U» sau «V» (aspect diferit de cel din biopsia gastrică);

- **teste biochimice:** catalaza, oxidaza și ureaza pozitive (tabelul 33.2).

Examinarea prin cultură a *H.pylori* poate fi mai puțin sensibilă decât metodele rapide de detectare, datorită fragilității deosebite a acestei bacterii în condițiile mediului extern. Are avantajul specificității absolute și posibilității de testare a sensibilității tulpinii izolate la metronidazol (tulpinile rezistente pot compromite sterilizarea mucoasei gastrice prin schema triplă de tratament: bismut + amoxicilină + metronidazol).

33.3.2. Metode neinvazive

33.3.2.1. Diagnostic serologic

Aproximativ 95% din persoanele colonizate cu *H.pylori* au niveluri decelabile de anticorpi serici de tip IgG și IgA. Evidențierea lor poate fi efectuată prin reacții ELISA sau latex-aglutinare cu antigeni parțial purificați obținuți prin extracție acidă. Aceste teste sunt folosite mai ales în studii epidemiologice.

Scăderea semnificativă a titrului anticorpilor după minimum 3 luni de la eradicarea bacteriei consecutiv unui tratament eficient a determinat preconizarea examenelor serologice în monitorizarea terapiei anti-*H.pylori*.

33.3.2.2.1. Testul respirației cu uree marcată

Ureea conținând un izotop de carbon (C^{13} sau C^{14}) este administrată per os persoanei investigate. În stomac, sub acțiunea ureazei *H.pylori*, va fi eliberat CO_2 marcat, care va trece în sânge și apoi va fi eliminat prin aerul expirat în care va fi detectat și cuantificat. Inconvenientul metodei este dependența de dotări speciale extrem de costisitoare.

33.3.3. Biopreparate pentru diagnosticul și tratamentul infecțiilor cu *C.jejuni/coli* și *H.pylori*

- Seruri imune anti-*C.jejuni* și anti-*C.coli* pentru identificarea antigenilor

lipopolizaharidic și proteic flagelar.

■ Fagi pentru lizotipia *C.jejuni* și *C.coli*.

■ Suspensii de *C.jejuni/coli* pentru reacția de aglutinare, imunofluorescență indirectă; dezintegrate sonice de *C.jejuni/coli* pentru RFC, ELISA și sensibilizarea hematiilor utilizate în hemaglutinarea indirectă.

■ Rondele cu acid nalidixic și cefalotină pentru testul adițional de diferențiere a speciilor de *Campylobacter* și *Helicobacter*.

■ Ser monoclonal anti-*H.pylori* marcat fluorescent pentru depistarea și identificarea *H.pylori* în biopsii de mucoasă gastrică.

■ Antigeni de *H.pylori* pentru diagnosticul serologic al infecției prin ELISA și latex-aglutinare.

■ Uree marcată cu carbon radioactiv pentru depistarea infecției cu *H.pylori* prin testul respirației.

■ Medicamente antimicrobiene: eritromicină pentru infecțiile cu *C.jejuni/coli*; asociația bismut + amoxicilină + metronidazol pentru infecțiile cu *H.pylori*.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE PSEUDOMONADE

34.1. DATE GENERALE

34.1.1. O minidefiniție

Pseudomonadele sunt bacili gramnegativi, mobili prin unul sau mai mulți flageli polari (o singură specie este imobilă: *Pseudomonas mallei*). Strict aerobi. Unii cresc anaerob în prezența nitraților. Oxidazopozitivi și catalazopozitivi. Nefermentativi, atacă zaharurile oxidativ fără producere de gaz. Unele specii produc pigmenți difuzabili fluorescenți.

34.1.2. Repere taxonomice

Genul *Pseudomonas* are peste 260 de specii și face parte din familia *Pseudomonadaceae*. Pe baza homologiei rARN/ADN genul a fost împărțit în 5 grupe de specii, dar aceasta depășește obiectivele manualului. Noi vom împărți pseudomonadele din punct de vedere medical în:

- specii patogene pentru animale și om: *P.mallei*, agentul etiologic al morvei, și *P.pseudomallei*, agentul melioidozei;
- specii condiționat sau accidental patogene: *P.aeruginosa*, specia tip a genului și cel mai frecvent izolată din prelevate patologice, *P.cepacia*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.stutzeri*, *P.maltophilia* etc.

34.1.3. Habitat

Pseudomonadele sunt organisme saprofite larg răspândite în natură: apă, sol, nămol, vegetale, intestinul omului și animalelor. Singura specie obligat parazită a animalelor, *P.mallei*, este astăzi eradicată în majoritatea țărilor, iar *P.pseudomallei* trăiește în apa și solul umed din zonele ecuatoriale, unde îmbolnăvește animale și accidental omul.

P.aeruginosa, numită comun bacilul piocianic (adică bacilul puroiului albastru, după capacitatea sa de a colora în verde-albastru puroiul), este frecventă în fondul microbial al anumitor spitale (mai ales în secții de urologie, pediatrie etc.), pentru că este uzual prezentă în microflora organismului, contaminează suprafețele din jur și se multiplică rapid, chiar și în frigider, în alimente, soluții medicamentoase, apă distilată, soluții de antiseptice și dezinfectante cu nivel jos de eficiență. În schimb, moare instantaneu la fierbere, în 10

minute la 60°C, după 2—5 minute în soluție 3—5% de cloramină sau 2—3% fenol.

34.1.4. Factori de patogenitate

Bacilul piocianic este o bacterie invazivă și toxigenă. Are factori de patogenitate:

- *somatici*: pili cu funcție adezivă, glicocalix cu funcție adezivă și protectoare, endotoxină;

- *solubili*: două exotoxine, A și S, care inhibă sinteza proteică, enzime (proteaze, elastaze, lipază), hemolizine, un chelator de fier (piochelina) și piocine.

34.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu pseudomonade

În ciuda echipamentului variat de patogenitate (mai bogat și mai bine cunoscut la *P.aeruginosa*) pseudomonadele saprofite nu pot cauza infecții la gazda normoreactivă cu barierele antiinfecțioase externe întregi.

Porți de intrare ale infecției sunt: plăgile și arsurile întinse, epitelul respirator cu transportul mucociliar afectat, uropiteliul pacienților cateterizați pentru uropatii obstructive. La pacienții cu imunodeficiențe avansate (e. g. hemopatii maligne ș. a.) bacilul piocianic translocat prin mucoasa intestinală intactă generează bacteriemii. Administrări medicamentoase prin aerosolizare cu instalații sau soluții contaminate, cateterizarea căilor respiratorii în serviciile de reanimare și terapie intensivă sunt alte condiții de risc. Foarte grav evoluează infecțiile cu pseudomonade la pacienții hipocomplementemici sau neutropenici.

34.1.6. Infecții cu pseudomonade

P.aeruginosa și alte pseudomonade determină:

- infecții supurative ale plăgilor și arsurilor;
- infecții ombilicale la nou-născuți;
- otite externe maligne;
- otite medii, mastoidite, sinuzite, bronhopneumonii, pleurezii;
- boală diareică la copii, de la diaree ușoară până la enterite necrozante;
- cistite, pielite;
- infecții oculare;
- infecții bacteriemice și septicemice cu localizări metastatice: endocardite, endarterite, osteomielite, artrite, meningite.

P.aeruginosa determină peste 15% din infecțiile nozocomiale la copii și adulți, mai ales în clinicile de chirurgie, urologie, în secțiile de reanimare și terapie intensivă sau la copii distrofici. Infecția este endogenă (tulpini de bacil piocianic din microflora normală sau disbiotică a pacienților) sau exogenă (instrumentar, medicamente, obiecte, apă sau alimente contaminate).

34.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU PSEUDOMONADE

34.2.1. Diagnosticul microbiologic

34.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează, în funcție de forma clinică și localizarea infecției: exsudate și puroi, spută, lichid cefalorahidian, biopsii, urină, fecale.

Pentru investigația epidemiologică se prelevă lavajul instrumentarului, aparaturii de anestezie și reanimare, soluții medicamentoase (colire, soluții pentru inhalatii, pentru perfuzii), medii nutritive pentru sugari, soluții de antiseptice și dezinfectante cu nivel jos de eficiență.

34.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă este orientativă: depistează bacili fini gramnegativi, nesporulați.

34.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se însămânțează prelevatele, după natura lor, pe medii care permit izolarea, pe lângă bacilul piocianic, și a altor specii eventual asociate: geloză-sânge, mediul Endo, geloză nutritivă, bulion peptonat glucozat etc.

Izolarea din prelevatele contaminate se face cantitativ: se însămânțează pe plăcile de izolare câte 0,1 ml din diluțiile decimale ale prelevatelor în soluție salină izotonă. Se incubează culturile peste noapte la 37°C.

Etapa II. Se repică coloniile suspecte, S sau R, cu tendință de invadare a mediului, hemolitice, pigmentate, cu luciu metalic și cu miros asemănător florilor de salcâm, pentru a obține cultura pură necesară identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere (vezi și tabelul 34.1).

■ *De cultivare* (vezi mai sus). Pigmenții produși difuzează în mediu. Cele mai multe tulpini de bacil piocianic produc pioverdină (pigment galben-verzui fluorescent) și piocianină (pigment albastru), unele produc pigment roșu, altele nu sunt pigmentogene. Pigmentogeneza se studiază cel mai bine în culturile pe mediul King-Ward-Roney.

■ *Microscopice*: bacili fini gramnegativi, nesporulați, mobili.

■ *Biochimice*. Studiul caracterelor biochimice este indispensabil pentru tulpinile nepigmentogene și pentru diferențierea corectă a speciilor (tabelul 34.1). Bacilul piocianic este strict aerob, oxidazopozitiv, scindează glucoza oxidativ, produce gelatinază, lipază, frecvent urează și foarte rar lecitinază. Utilizează citratul. Nu produce indol, H₂S, iar reacțiile cu roșu metil și Voges-Proskauer sunt negative.

■ În laboratoarele de referință sunt identificate *serovarul* și *lizovarul*, testată *patogenitatea*.

Tabelul 34.1. Caractere diferențiale ale pseudomonadelor cu importanță medicală actuală

Caractere	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.cepacia</i>	<i>P.stutzeri</i>	<i>P.maltophilia</i>	<i>P.alcaligenes</i>
Pigmenți:							
■ ploverdină	d	+	d	—	—	—	—
■ piocianină	d	—	—	—	—	—	—
Oxidază	+	+	+	+	+	+	+
Arginindihidrolază	+	+	+	—	—	—	—
Lizindecarboxilază	—	—	—	+	—	+	—
Ornitindecarboxilază	—	—	—	d	—	—	—
Hemoliză	d	d	—	—	—	—	d
Hidroliza:							
■ gelatinei	d	+	—	d	—	+	—
■ lecitinei	—	+	—	d	—	—	—
■ tween 80 (lipază)	d	d	—	+	+	+	d
■ ureei	d	d	d	d	d	—	d
Creșterea:							
■ la 42°C	+	—	—	d	d	d	d
■ în mediu cu 1%	d	d	d	d	—	—	—
■ TTC							
Sensibilitatea la:							
■ polimixină B	+	+	+	—	+	+	+

Simboluri: «+» — 90% din tulpini pozitive; «—» — 90% din tulpini negative;
d — 11—89% din tulpini pozitive; TTC — trifeniltetrazoliuclorid.

■ **Antibiograma** este obligatorie pentru că bacilul piocianic dobândește frecvent rezistență multiplă la antibiotice. Fiind natural rezistent la o serie din antibioticele clasice, se testează tulpinile izolate față de: anumite peniciline (carbenicilina, azlocilina, ticarcilina etc.), anumite aminoglicozide (gentamicina, tobramicina, amikacina), anumite cefalosporine (cefsulodina, cefoperazona etc.), chinolone și polimixina B.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se completează buletinul de analiză. La examenul prelevatelor contaminate pseudomonadele au semnificație clinică numai izolate în cantitate mai mare de 10^5 UFC/ml sau g de produs patologic. Aceste rezultate sunt esențiale pentru terapia infecțiilor determinate de pseudomonade și pentru măsurile de combatere și profilaxie a infecțiilor nozocomiale în care sunt atât de frecvent implicate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LISTERIOZEI

35.1. DATE GENERALE

35.1. 1. O minidefiniție

Listeriile sunt mici bacili grampozitivi, nesporulați, neacidorezistenți. Aerobi și microaerofili, cultivă între 1 și 45°C, fiind mobili numai în culturile la 20—25°C. Catalazopozitivi și oxidazonegativi, atacă zaharurile fermentativ.

35.1.2. Repere taxonomice

Genul *Listeria* reunește 8 specii, dintre care numai două, *L.monocytogenes* și *L.ivanovii*, pot îmbolnăvi omul. Din combinații ale antigenilor somatici (factorii O) și flagelare (factorii H) rezultă mai multe serovaruri. *L.monocytogenes* are 13 serovaruri, *L.ivanovii* numai unul.

35.1.3. Habitat

Listeriile au răspândire cosmopolită și sunt ubicvitare în ambianța noastră: se izolează din apele de suprafață, apele reziduale, sol, nămol; sunt prezente în fecalele unei game largi de animale (mamifere, păsări, pești, nevertebrate) și în vegetale în descompunere.

Pot contamina alimente ca lapte, brânzeturi, carne, zarzavaturi, iar capacitatea de a tolera substanțele conservante și de a crește la temperatura frigidereilor ridică probleme deosebite pentru conservarea prin refrigerare a alimentelor contaminate cu *Listeria*.

La om portajul fecal și genital de *Listeria* variază între 0,6 și 70%, cu o medie de 5—10%.

Cu o astfel de răspândire, înțelegem de ce principala poartă de intrare în organism este cea orală, dar și transmiterea sexuală este posibilă.

35.1.4. Factori de patogenitate

L.monocytogenes este o bacterie facultativ intracelulară a cărei virulență este determinată de mai mulți factori:

- Hemolizine, listeriolizine α și β , oxigenlabile și tiolactivate asemănător streptolizinei O. *L.ivanovii* produce o hemolizină asemănătoare listeriolizinei β , dar antigenic diferită.

- Structuri parietale sau de înveliș care determină monocitoză și imunosupresie.
- Adezine, invazine (fosfolipază etc.), superoxidismutază și catalază, care îi asigură supraviețuirea în fagozomi.

35.1.5. Receptivitatea la listerioze

La adultul normoreactiv infecțiile cu *L.monocytogenes* evoluează în general inaparent. Infecții manifeste clinic sunt, în general, mai rare și benigne.

Gazda imunocompromisă (alcoolici, imunosupresați etc.) au receptivitatea crescută. Dar cel mai receptiv la listerioză, care se transmite transplacentar, este fătul.

35.1.6. Listeriozele

Infecțiile cu *L.monocytogenes* după ingestia de doze masive prin consum de alimente în care bacteria s-a multiplicat evoluează ca *toxinfecții alimentare cu sindrom diareic*. Alte infecții, relativ benigne, ale adultului normoreactiv sunt: *angină cu mononucleoză, conjunctivită, infecții ale tractusului urinar sau genital, cutanate*.

Foarte grave sunt *meningoencefalitele și septicemiile* cu *L.monocytogenes* la gazde imunocompromise.

Aproape 1/2 din listerioza umană evoluează ca *infecție perinatală*. Gravida în ultimul trimestru de sarcină poate face o infecție benignă sau inaparentă, care se transmite transplacentar produsului matur cu meningoencefalită sau septicemie cu noduli necrotici diseminați predominant în ficat.

Infecții cu *L.ivanovii* au fost rar semnalate.

35.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN LISTERIOZE

35.2.1. Diagnosticul microbiologic

35.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează probe de alimente, fecale, urină, exsudate, lichid cefalorahidian sau sânge, în raport cu localizarea infecției la adult. De la avortoni sau nou-născuții prematuri și infectați se prelevă probe de țesut hepatic, creier, lichid cefalorahidian, sânge.

35.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă orientează diagnosticul către listerioză când, în prelevate necontaminate, depistează bacili fini grampozitivi în contextul unei reacții inflamatorii cu polimorfonucleare și macrofage.

35.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează prelevatele necontaminate pe o placă cu geloză-sânge, iar cele contaminate pe geloză-sânge selectivă prin adaos de acid nalidixic (40 $\mu\text{g/ml}$) și tripaflavină (40 $\mu\text{g/ml}$), cu incubare peste noapte la 37°C în atmosferă cu 10% CO₂. Procentul izolărilor crește dacă, în afara epuizării inițiale pe geloză-sânge, prelevatele patologice se însămânțează pentru *Imbogățire în bulion cu tioglicolat de sodiu, cu incubare la 4°C* și cu repicări săptămânale pe mediul selectiv.

Etapa II. Se urmărește apariția coloniilor rotunde cu diametrul de 0,5—1,5 mm, ușor convexe, S, cenușii-albăstrii, cu irizație albastră-verzuie la iluminare oblică, vâscoase, dar ușor emulsionabile. Coloniile de *L.monocytogenes* se înconjură după 48 ore cu o zonă îngustă de β -hemoliză, iar cele de *L.ivanovii* cu zone duble sau triple de β -hemoliză pronunțată. Se verifică microscopic 2—3 colonii pentru prezența bacililor fini grampozitivi și se repică pe panta de geloză-sânge, pentru acumularea de cultură pură necesară identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele suspecte pe baza următoarelor caractere:

■ **Microscopice.** Listeriile sunt bacili grampozitivi, colorați uniform, de 0,4—0,5 μm diametru și 0,5—2 μm lungime. În culturi bătrâne apar în forme filamentoase. Se dispun izolat, în scurte lanțuri (confuzie posibilă cu streptococii), în palisade și unghiuri (confuzie posibilă cu corinebacteriile). Morfologic pot fi confundate și cu *Erysipelothrix*.

■ **Testul catalazei,** pozitiv pentru listerii, elimină confuzia cu streptococii catalazonegativi.

■ **Testele de mobilitate** diferențiază listeriile, mobile, de corinebacterii și *Erysipelothrix*, organisme imobile. Testele se fac pe culturi incubate la 22—25°C. În preparatul umed între lamă și lamelă listeriile au mișcări dezordonate de rostogolire, iar însămânțate prin înțepare în coloană de geloză moale opacifiază mediul intens cu aspect umbeliform.

■ **Testul chertoconjunctivitei** (testul Anton) după inocularea culturii în sacul conjunctival la iepure sau cobai diferențiază *L.monocytogenes* și *L.ivanovii*, care dau testul pozitiv, de listeriile nepatogene cu test negativ.

■ **Testul CAMP.** Pe geloză cu sânge de berbec *L.monocytogenes* dă testul pozitiv cu *S.aureus*, iar *L.ivanovii* cu *Rhodococcus equi*.

■ **Identificarea serovarurilor** de *L.monocytogenes* se face corect numai în laboratoarele de referință prin reacții de aglutinare pe lamă și în tuburi. Prezintă interes epidemiologic.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele testelor de identificare și se redactează buletinul de analiză.

35.2.2. Diagnosticul serologic

Se urmărește dinamica anticorpilor anti-*Listeria monocytogenes* prin RFC, imuno-precipitare sau hemaglutinare indirectă, utilizând antigeni tripsinați și seruri adsorbite (pentru a elimina reacțiile încrucișate cu stafilococi și enterococi). Titruri de 1:60 sunt suspecte, iar creșterea de cel puțin 4 ori a titrului după 10—14 zile certifică listerioza. O reacție negativă nu poate exclude infecția cu *L.monocytogenes*, dat fiind predominanța mecanismelor imunitare celulare.

35.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul listeriozei

- Seruri aglutinante anti-O și anti-H sunt dificil de preparat, iar utilizarea lor, de regulă, este limitată în laboratoarele de referință.
- Antigeni tripsinați pentru serodiagnostic prin aglutinare în tub, RFC etc.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEGIONELOZELOR

36.1. DATE GENERALE

36.1.1. O minidefiniție

Legionelele sunt mici bacili, ocazional cu forme filamentoase. Au perete de tip gram-negativ, dar fixează prost coloranții de anilină. Nesporulați. Uzual mobili prin unul sau mai mulți flageli subpolari. Aerobi, cultivă numai pe medii suplimentare cu L-cisteină și săruri de fier. Catalazopozitivi, oxidazonegativi sau slab pozitivi. Inactivi asupra carbohidraților.

36.1.2. Repere taxonomice

Sunt încadrați în familia *Legionellaceae*, genul *Legionella*, care în prezent reunește 35 de specii cu 55 serogrupuri definite prin antigenul somatic lipopolizaharidic. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali în cadrul serogrupurilor au fost definite serovaruri, care sunt markeri epidemiologici utili, dar puțin accesibili.

36.1.3. Habitat

Habitatul natural al legionelelor sunt sursele și rezervoarele naturale sau artificiale de apă, unde stabilesc relații complexe cu microbiocenozele proprii acestor biotopuri: cianobacteriile sau algele verzi le furnizează nutrienți prin transformarea CO₂ în compuși organici; amoebele le ingeră în număr mare și le mențin viabile în aerosoli. Căldura (35—45°C) le favorizează multiplicarea. Produc cantități mari de glicocalix, care le favorizează persistența și acumularea în tuburi și conducte de cauciuc, sticlă, chiar siliconate. Suprafețele de oțel inoxidabil și de cupru le sunt mai puțin favorabile, dar fierul, zincul și aluminiul le favorizează creșterea. În apa distilată supraviețuiesc și un an. Au fost izolate din nămol, noroi și apa de ploaie, dar niciodată din sol și pulberi.

Sunt transmise prin aerosolii produși de instalațiile de condiționare a aerului, nebulizatoare, ploaie.

36.1.4. Factori de patogenitate

Legionelele sunt bacterii *facultativ intracelulare*. Afectarea mai multor organe în cursul legionelezelor sugerează intervenția unor toxine, dintre care mai importante apar:

■ O *citotoxină termostabilă*, care protejează legionelele de efectul bactericid al polimorfonuclearelor neutrofile prin deprimarea formării de super-oxid, a fost identificată la mai multe specii de *Legionella*. Este letală pentru embrionii de găină și culturile celulelor ovariene ale hamsterilor de China.

■ O *protează*, produsă de *Legionella pneumophila*, inoculată intranasal la cobai produce efecte similare cu cele din boala legionarilor umană: zone alveolare de hemoragie și edem cu moartea a 25% din animale în 30 minute și a 25% până la 24 ore; restul de 50% din supraviețuitori dezvoltă după 24 ore leziuni pneumonice fibrinopurulente confluențe.

■ *Hemolizinele* produse de legionele lizează eritrocitele mai multor specii (om, iepure, oaie, cobai), dar cel mai puternic efect îl au asupra eritrocitelor de câine.

Endotoxina pare a avea un efect limitat în patogenia legionelelor.

36.1.5. Receptivitatea la legioneleze

Receptivitatea la infecția aerogenă cu legionele este mai mare și evoluția îmbolnăvirilor mai gravă după vârsta de 50 ani și la imunosupreși. Plăgile, inclusiv cele postoperatorii, în contact cu apa contaminată pot fi poartă de intrare pentru legionele.

Tabelul 36.1. Speciile de *Legionella* patogene pentru om

Specii	Număr de serogrupuri	Izolare de la om	Răspuns imun la om	Boala cauzată la om
<i>L.anisa</i>	1	+	+	Pn
<i>L.bozemanii</i>	2	+	+	Pn
<i>L.cincinnatiensis</i>	1	+	...	Pn
<i>L.dumoffii</i>	1	+	+	Pn
<i>L.feeleii</i>	2	+	+	SG1:Pn, FP SG2:Pn
<i>L.gormanii</i>	1	+	+	Pn
<i>L.hackeliae</i>	2	+	...	Pn
<i>L.longbeachae</i>	2	+	+	Pn
<i>L.maceachernii</i>	1	+	...	Pn
<i>L.micdadei</i>	1	+	+	Pn, FP
<i>L.pneumophila</i>	15	+	+	Pn, FP
<i>L.wadsworthii</i>	1	+	+	Pn

Abrevieri: SG — serogrup; FP — febră de Pontiac; Pn — pneumonie; ... — lipsa informațiilor.

36.1.6. Legionelozele

Din cele 35 specii de *Legionella*, cunoscute în prezent, numai pentru 12 a fost argumentată clinic, microbiologic și serologic patogenitatea la om (tabelul 36.1). Patogenitatea naturală pentru animale este necunoscută. Principalul agent etiologic al infecțiilor este *Legionella pneumophila*, specie cu 15 serogrupe, dintre care serogrupul 1 determină cele mai multe infecții.

Principalele două boli produse de legionele sunt:

■ *Boala legionarilor*, care are o incubatie de 5—6 zile și se manifestă ca o pneumonie, în general severă (focare fibrinopurulente extensive, cu tendință de excavare la imunodeprimați, reacție pleurală), cu manifestări multisistemice (digestive, renale, hepatice, psihice). Boala evoluează mortal la 15—20% din pacienți.

■ *Febra de Pontiac* este tot o infecție respiratorie acută, dar fără pneumonie. Are incubatie scurtă de cca 36 ore și evoluează benign, cu febră, cefalee, mialgii, spre vindecare spontană după 5—6 zile.

Mai rar legionelozele se manifestă ca *pericardite*, *abcese la nivelul punctelor de hemodializă*, *peritonite*, *infecții ale plăgilor*.

Uneori, după vindecarea clinică, persistă o *infecție latentă* cu *Legionella*, care întreține mulți ani un titru ridicat al anticorpilor.

36.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A LEGIONELOZELOR

36.2.1. Diagnosticul direct (microbiologic)

36.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de forma clinică a infecției se prelevă și se examinează: aspirat transtraheal, spălătură bronșică, biopsii pulmonare, exsudat pleural, pericardic (dacă există). Sputa asigură șanse minime de izolare a legionelelor. Din probe de sânge heparinat, se separă prin centrifugare leucocitele, care sunt lizate și însămânțate pe mediul de izolare, puroi din exsudate din abcese și plăgi.

Pentru depistarea antigenică a legionelelor infectante se prelevă probe de urină.

36.2.1.2. Microscopia directă

Colorația Gram este practic inutilă, colorația Giménez sau colorația Dieterle prin impregnație argentică dau rezultate nesatisfăcătoare.

Indicată este *colorația imunofluorescentă directă*, care are sensibilitatea de 40—50%, dar specificitatea de 95%.

36.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează prelevatele necontaminate pe o placă cu geloză BCYE (*Biftered Charcoal Yeast Extract*), care prin conținutul în clorhidrat de L-cisteină și pirofosfat feric satisface necesitățile nutritive specifice legionelelor, iar prin cărbunele activat previne oxidarea fotochimică în extractul de levură. Pentru izolări din prelevate contaminate rezultate mai bune decât utilizarea unui mediu selectiv prin adaos de antibiotice (polimixină B, cefazolin, vancomicină) dă decontaminarea chimică prin acidifierea probelor la pH 2 înainte de cultivare. Pentru hemoculturi se folosește mediul CYE difazic adăugat cu L-cisteină și pirofosfat feric.

Singura carboxifilă este *L.gormanii*. Pentru a-i asigura izolarea, se incubează culturile la 37°C în atmosferă cu 2,5% CO₂ (borcan cu lumânare). Concentrații de CO₂ peste 5% sunt inhibitorii pentru legionele.

Etapa II. Se urmăresc culturile 7 zile. Primele colonii apar abia după 2—3 zile de incubare. În subculturi legionelele cresc mai rapid: în 1—2 zile.

Inițial coloniile sunt punctiforme și cultura poate fi observată în ariile confluențe. Diametrul lor crește progresiv și ajunge la 1—2 mm după 3 zile și la 3—4 mm după o săptămână. Sunt rotunde, cu margini ușor neregulate, convexe, strălucitoare, verzui. Examinele cu lupa, în transparență, au aspect reticulat de «sticlă tăiată». Se repică 2—3 colonii pe un mediu clar, e.g. geloză Feeley-Gorman, pentru a obține cultura pură cu caracterele necesare identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

■ **Microscopice.** Legionelele apar ca bacili gramnegativi polimorfi de 0,3—0,9 μm grosime și 2—20 μm lungime palid colorați. Pe frotiurile colorate Dieterle sau Giménez se fixează mai intens colorantul. În primele subculturi *L.pneumophila* prezintă granule sudanofile de β-hidroxibutirat, care umflă corpul bacililor.

■ **De cultivare.** Sunt strict aerobe. Nu cultivă pe geloză-sânge, ci numai pe mediu special îmbogățit, formând colonii cu aspectul descris mai sus. Examinele în camera obscură sub radiație ultravioletă coloniile unor specii sunt fluorescente (tabelul 36.2).

■ **Biochimice.** Unele caractere sunt pozitive (mobilitatea, catalaza), altele negative (reducerea nitraților, ureaza, fermentarea carbohidraților), iar altele variabile cu specia (pigmentogeneza pe mediu adăugat cu tirozină, oxidaza, hidroliza hipuratului, producerea de β-lactamază) (tabelul 36.2).

■ **Structura antigenică** este identificată prin colorație imunofluorescentă sau aglutinare cu seruri specifice de specie și serogrup. Utilizarea anticorpilor monoclonali evită reacțiile încrucișate intra- sau interspecifice în cadrul genului *Legionella* sau cu alte genuri (*Yersinia pestis*, *Pseudomonas fluorescens* etc.).

■ **Identificarea acizilor grași din structura peretelui celular** sau a ubiquinonelor din membrana citoplasmică se face prin cromatografie gaz-lichid, metodă inaccesibilă încă majorității laboratoarelor.

Etapa IV. Se analizează și interpretează rezultatele testelor de identificare și se completează buletinul de analiză. Dacă specificitatea izolării este de 100%, sensibilitatea nu depășește 80%.

Tabelul 36.2. Caractere diferențiale ale speciilor de *Legionella* patogene pentru om

Caractere	<i>L. anisa</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. cin-natiensis</i>	<i>L. dumofii</i>	<i>L. felell</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. haackeliae</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. maca-cheronii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. wadsworthii</i>
Creștere pe geloză-sânge	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Creștere pe geloză BCYE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Autofluorescență	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
Granule sudanofile	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Mobilitate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
Brunificare pe mediul cu tirozină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
Catalază	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducerea nitraților	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acid din carbohidrați	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxidază	+	V	—	—	—	—	+	+	+	+	V	—
β -Lactamază	+	V	...	+	—	+	+	V	—	—	+	+
Hidroliza hipuratului	—	—	—	—	V	—	—	—	—	—	+	—

Simboluri: În coloana «Autofluorescență»: \leftrightarrow — alb-albastru, \leftrightarrow — absentă; în alte coloane: \leftrightarrow — 90% din tulpini pozitive; \leftrightarrow — \pm 90% din tulpini negative; ... — lipsa informațiilor; V — reacții variabile.

36.2.1.4. Detectarea antigenilor de *Legionella* în probele de urină

Se face prin ELISA, metoda radioimunologică sau latex-aglutinare. La o specificitate și sensibilitate asemănătoare, detectarea antigenului urinar permite un diagnostic mai rapid decât izolarea legionelilor.

36.2.2. Diagnosticul serologic

Se prelevă probe de ser precoce (în prima săptămână de boală) și tardiv (după 15, apoi după 30 zile de la prima recoltă). Se urmăresc anticorpii prin imunofluorescență indirectă. Semnificative pentru diagnostic sunt titruri peste 1:128 (*L. pneumophila*) sau 1:256 (alte specii) ori o creștere mai mare de 4 ori a titrului în serurile tardive față de serul precoce.

36.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul legionelozelor

- Seruri imune anti-*Legionella* cu specificitate de specie și serogrup pentru identificarea antigenică a izolatelor prin aglutinare sau imunofluorescență.
- Seturi de reactivi pentru identificarea antigenilor solubili de *Legionella* prin ELISA, RIA sau latex-aglutinare.
- Antigen pentru serodiagnostic prin imunofluorescență indirectă.
- Antibioticul de elecție pentru terapia legionelozelor: eritromicina, asociată în cazurile foarte grave cu rifampicină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RICKETTSIOZELOR

37.1. DATE GENERALE

37.1.1. O minidefiniție

Rickettsiile sunt mici organisme pleomorfe, uzual intracelulare, găzduite de artropode. Sunt patogene pentru om și alte vertebrate. Deși au metabolism energetic și capacități de biosinteză independente, nu pot fosforila glucoza ca substrat energetic, ci folosesc metaboliți intermediari din gazdă, pe care îi oxidează în ciclul acizilor tricarboxilici propriu.

37.1.2. Repere taxonomice

În familia *Rickettsiaceae*, au fost diferențiate trei triburi bazate pe afinitățile de gazdă, dintre care numai două îmbolnăvesc vertebratele:

Tribul I *Rickettsieae*, care cuprinde specii patogene pentru om și specii înrudite cu ele.

Tribul II *Ehrlichieae*, care îmbolnăvesc vertebrate, mai frecvent animalele domestice. Numai două specii pot infecta omul: *Ehrlichia sennetsu* și, accidental, *E.cannisi*.

Tribul *Rickettsieae* are trei genuri: *Rickettsia*, *Rochalimaea* și *Coxiella* diferențiate conform caracterelor precizate în tabelul 37.1.

Pe baza caracterelor biologice (localizarea în celula gazdă, structura antigenică) și clinico-epidemiologice ale infecțiilor determinate, în genul *Rickettsia* sunt identificate trei grupe de specii (tabelele 37.2, 37.3).

- Grupul tifosului cu *R.prowazekii* și *R.typhi* (sinonim *R.mooseri*).
- Grupul febrei pătate cu *R.rickettsii*, *R.conorii*, *R.australis*, *R.sibirica* și *R.akari*.
- Grupul tifosului de lăstăriș cu *R.tsutsugamushi*.

37.1.3. Habitat

Rickettsiile sunt găzduite în natură de către o serie de vertebrate, inclusiv omul, între care se transmit prin ectoparaziți hematofagi (tabelul 37.2). Unele specii în organismul artropodului vector se transmit transovarian între generații. Doar *R.prowazekii* își îmbolnăvește gazda nevertebrată, păduchele de corp (*Pediculus humanus* var. *corporis*), care face o infecție digestivă, moare în 1—3 săptămâni fără a transmite infecția la

descendenți. Alte excepții sunt: *Rochalimaea quintana* cu omul ca singură gazdă vertebrată și *Coxiella burneti*, care, grație endosporului rezistent, se poate transmite între gazdele receptive atât prin căpușe, cât și prin elemente contaminate de mediu sau lapte.

Tabelul 37.1. Caractere diferențiale între genurile tribului *Rickettsieae*.

Caractere	<i>Rickettsia</i>	<i>Rochalimaea</i>	<i>Coxiella</i>
Cultivarea pe medii artificiale	—	+	—
Creșterea în celula eucariotă:			
■ în citoplasmă sau nucleu	+	—	—
■ în fagolizozomi	—	—	+
■ epicelular	—	+	—
Prezența endosporilor	—	—	+
Metabolism			
■ pH optim	7,0	7,0	4,5
■ CO ₂ produs din:			
glucoză	—	—	±
glutamat	+	±	+
succinat	±	+	+

37.1.4. Factori de patogenitate

Rickettsiile sunt *organisme invazive*. Suspensiile vii de *Rickettsia* au și *efect toxic*: o doză mare de rickettsii vii inoculată intravenos la șoareci îi omorâă în 1—8 ore prin hiperpermeabilizare capilară; supraviețuitorii efectului toxic fac, abia după câteva zile de incubare, o infecție mai mult sau mai puțin gravă, în raport cu specia de rickettsia inoculată (tabelul 37.3). Efectul toxic lipsește la *Coxiella* și la *Rochalimaea*.

37.1.5. Receptivitatea la rickettsioze

Receptivitatea omului la rickettsiile prezentate în tabelul 37.2 este generală. În același tabel sunt menționate cele mai receptive gazde animale la infecția experimentală.

37.1.6. Infecții și boli determinate de rickettsii

Rickettsiile au tropism pentru endoteliul vascular. Leziunea caracteristică este o endotelită trombozantă cu inflamație periadventițială a vaselor mici, *nodulul Popov-Frankel*, răspândită difuz.

Rickettsiozele omului *evoluează ciclic* cu febră, stare tifică însoțite frecvent de exantem cu aspect variat în funcție de specia infectantă. *Frecvent infecția își continuă evoluția latent cu posibilități de reactivare.*

Tabelul 37.2. Tribul *Rickettsiae*: boli umane — transmitere și răspândire geografică, ciclul natural al infecției

Grup biologic	Specii	Boală umană	Transmitere la om	Distribuție geografică	Ciclul infecției naturale	
					artropod vector	gazda vertebrată
Grupul tifos	<i>R. prowazekii</i>	Tifos epidemic	Fecalele păduchelului infectat: grataj cutanat, inhalare	Cosmopolită	Păduche de corp (<i>P. humanus</i> var. <i>corporis</i>) Păduchi și purici ai veveriței zburătoare	Om Veverița zburătoare (in S.U.A.)
	<i>P. prowazekii</i>	Boala Brill-Zinsser (tifos de recădere)	Infecție latentă reactivată	Cosmopolită	—	Om
	<i>R. typhi</i>	Tifos murin (tifos endemic)	Fecalele puricelui infectat: grataj cutanat	Cosmopolită	Purici de șobolan: <i>Xenopsilla cheopis</i>	Șobolan
Grupul febre pătate	<i>R. rickettsii</i>	Febră pătată a Munților Stâncoși	Înjepătură de căpușă	America	Căpușe: <i>Dermacentor</i> , <i>Amblyomma</i> , <i>Haemaphysalis</i>	Mamifere sălbatice mici, mijlocii; păsări și câini
	<i>R. conorii</i>	Febră butonoasă	Înjepătură de căpușă	Litoralul mediteranean, Africa, India	Căpușă: <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mamifere sălbatice mici; câini
	<i>R. sibirica</i>	Tifos de căpușă Nord-Asiatic (siberian)	Înjepătură de căpușă	Siberia, Mongolia	Căpușă: <i>Dermacentor</i>	Animale sălbatice și domestice
	<i>R. akari</i>	Rickettsioza veziculară	Înjepătură de Gamassidae (mici acarieni)	Rusia, N-E S.U.A.	<i>Gamassidae</i> (acarieni)	Șoarecele de casă
	<i>R. australis</i>	Tifosul de căpușă din Queensland	Înjepătură de căpușe	Australia	Căpușă: <i>Ixodes</i>	Rozătoare sălbatice mici
Grupul tifos de lăstărie	<i>R. tsutsugamushi</i>	Tifos de lăstărie	Înjepătură de <i>Trombiculidae</i> (mici acarieni)	Asia, Australia, Oceania	<i>Trombiculidae</i> (mici acarieni)	Rozătoare sălbatice mici; păsări
Febră de tranșee	<i>Rochalimaea quintana</i>	Febră de tranșee (febra de Wolhinia, febra de 5 zile, febra tibialgică)	Fecalele păduchelului infectat: grataj cutanat	Europa, Africa de Nord, Orientul Mijlociu, Mexic	Păduche de corp (<i>P. humanus</i> var. <i>corporis</i>)	Om
Febră Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Febră Q (tifos pulmonar)	Inhalare de pulberi sau aerosoli contaminați. Înjepătură de căpușă	Cosmopolită	Căpușe: <i>Ixodes</i> , <i>Haemaphysalis</i>	Mamifere sălbatice mici; vite, capre, oi

Tabelul 37.3. Date importante pentru diagnosticul microbiologic și serologic al rickettsiozelor

Grupul biologic	Specii	Animalul experimental: (inoculare intraperitoneală) semne, gravitate	Nu- măr sero- va- ruri	Activitate serologică ¹						
				antigeni solubili		antigeni corpusculari				aglutina- rea <i>Proteus</i> OX (reacția Weil- Felix)
				RFC	RHAI	RFC	IF	Mic- ro- aglu- ti- nare	Neu- tra- lizarea «toxi- nei»	
Grupul tifos	<i>R. prowazekii</i>	Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19
	<i>R. typhi</i>	Cobai mascul: febră, inflamație scrotală; supraviețuiește	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19
Grupul febrei pătate	<i>R. rickettsii</i>	Cobai mascul: febră, necroză scrotală; moare frecvent	>4	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. conorii</i>	Cobai mascul: febră, inflamație scrotală; moare rar	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. sibirica</i>	Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	?	SS	SS	?	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. akari</i>	Șoarece: inactivitate, păr zburliit, tahipnee, ascită; moare	1	SG	SG	SS	SS	SS	Nu	Nu
	<i>R. australia</i>	Șoricel nou-născuți: infecție mortală. Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	?	SS	SS	?	Nu	OX19 sau OX2
Grupul tifos de lăstăriș	<i>R. tsutsugamushi</i>	Șoarece: ascită; moare	>8	ST	Nu	ST	ST	?	— ²	OXK
Febră de tranșee	<i>Rochalimaea quintana</i>	—	1	SS	Nu	SS	?	?	Nu	Nu
Febră Q	<i>Coxiella burneti</i>	Cobai mascul: febră, rar moare	2 faze ³	Nu	Nu	SS	SS	SS	Nu	Nu

¹ Abrevieri: RFC — reacția de fixare a complementului; RHAI — reacție de hemaglutinare indirectă cu hematii sensibilizate prin antigenul solubil; IF — imunofluorescență; SG — specificitate de grup; SS — specificitate de specie; ST — specificitate de serovar; ? — nu există informații.

² Rezultate greu de interpretat.

³ *Coxiella burneti* are o variație antigenică de fază. Din gazdele naturale (om, animale, artropode) se izolează în faza I particularizată printr-un antigen care reacționează în RFC cu anticorpii din infecția tardivă a cobaiului. Adaptarea la embrionul de găină, prin pasaje succesive în sacul vitelin, selectează faza II, care reacționează în RFC cu anticorpii din infecția precoce a cobaiului. Prin reinoculări la gazdele naturale, indivizii minoritari din faza I sunt selectați și întreaga populație infectantă revine la faza I. Și la om răspunsul imun precoc determină anticorpi fixatori de complement pentru faza II și numai în convalescența tardivă sau în infecția cronică apar anticorpi fixatori de complement specifici fazei I. Curent se identifică antigenii în fazele I și II prin reacții de microaglutinare și imunofluorescență.

Tifosul exantematic epidemic este determinat de *R. prowazekii*, iar reactivările infecției latente sunt cunoscute sub numele de boala Brill-Zinsser. *R. typhi* determină tifosul murin sau endemic.

Febrele pătate. *R. rickettsii* este cauza febrei pătate a Munților Stâncosi, cea mai gravă rickettsioză. *R. conorii* determină febra butonoasă, *R. australis* tifosul de căpușă din Queensland, *R. sibirica* tifosul de căpușă Nord-Asiatic, iar *R. akari* rickettsioza variceliformă.

Tifosul de lăstăriș este determinat de *R. tsutsugamushi*.

Rochalimaea quintana este agentul etiologic al febrei de 5 zile, boală numită și febră de tranșee sau febră de Wolhynia.

Coxiella burneti cauzează febra Q numită și tifos pulmonar. Infecția se poate croniciza cu leziuni de endocardită subacută sau hepatită granulomatoasă. La animale (bovine, ovine, caprine, rozătoare) infecția evoluează cronic sau latent cu reactivări în cursul sarcinii, când *C. burneti* se multiplică masiv în placentă, țesuturile fetale și uger.

Ehrlichia sennetsu determină la om, în Japonia, rickettsioza sennetsu manifestată prin febră însoțită de limfadenopatii postauriculare și cervicale cu limfocitoză.

37.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A RICKETTSIOZELOR

37.2.1. Diagnosticul microbiologic

Contagiozitatea și gravitatea rickettsiozelor restrânge acest diagnostic numai la laboratoarele de specialitate ale centrelor naționale de referință.

37.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează, în funcție de forma clinică a bolii, eventualele complicații și scopul urmărit (diagnostic la bolnav, investigație epidemiologică):

- Sânge prelevat în primele zile de boală. După ziua a 7-a, uneori până în ziua a 12-a, se încearcă izolarea rickettsiilor din chiagul sangvin mojarat, din sedimentul globular al sângelui heparinat, pentru a elimina anticorpii care pot împiedica izolarea.

- Artropode capturate după hrănirea cu sânge pe pacienții suspecți de rickettsioză (tifos exantematic: păduchi — vezi tabelul 37.2) sau de pe animale din focarul de infecție (căpuși de pe câini din locuința pacienților cu febră butonoasă, de pe animale din focare de febră Q sau febre pătate). Artropodele sunt capturate în recipiente prevăzute cu dop de bumbac sau plută, nu de cauciuc.

- De la pacienții cu febră Q, în afară de sânge, în raport cu complicațiile posibile, se mai prelevă: spută, exsudat pleural, lichid cefalorahidian, probe necroptice (valvule cardiace, țesut hepatic), iar de la animalele din focarul de infecție: placentă, lapte, urină, căpuși de pe animale.

37.2.1.2. Microscopia directă

Pe amprente sau secțiuni histologice din probe bioptice sau necroptice rickettsiile apar intracelular ca bacili fini sau cocobacili albaștri-purpurii în colorația Giemsa sau roșu viu în colorațiile Machiavello ori Giménez.

Colorația imunofluorescentă identifică rapid *R. rickettsii* pe secțiunile biopsiilor din leziunile cutanate ale pacienților cu febră pătate a Munților Stâncosi, *C. burneti* pe secțiuni

ale valvulelor cardiace de la pacienți decedați cu endocardită după febra Q. Aceste rickettsii pot fi identificate prin colorația imunofluorescentă și pe frotiuri din hemolimfa căpușelor infectate.

37.2.1.3. Izolarea și identificarea

Prelevatele fluide necontaminate se injectează intraperitoneal la animalele receptive (tabelul 37.2) direct la patul bolnavului. Când se prevede un interval mai mare de o oră până la inoculare, necondiționat prelevatele trebuie imediat congelate la -25°C . Intotdeauna se inoculează două animale.

Din probele tisulare necontaminate se injectează supernatantul suspensiei 10% (greutate/volum) în soluție salină izotonă centrifugată 15 minute la 1 000 rpm.

Toate probele contaminate (spută, urină, lapte, suspensii de placentă) se infectează numai după tratarea timp de 20—30 minute cu penicilină în proporție de 1 000—5 000 UI/ml inoculum.

Artropodele vii se imobilizează, prin refrigerare la $3-5^{\circ}\text{C}$, se spală repetat cu apă distilată sterilă (sau se mențin o oră în soluție 1:1 000 mertiolat de sodiu, dacă gazda de izolare este embrionul de găină), după care se omogenizează (10—15 artropode/10 ml soluție salină izotonă sterilă), și se injectează supernatantul tratat cu penicilină 1 000 UI/ml.

Izolarea rickettsiilor prin inocularea direct în sacul vitelin al embrionului de găină a prelevatelor patologice de la om este mai puțin sensibilă.

Unul din animalele care prezintă semne de boală (vezi tabelul 37.2) este sacrificat. Rickettsiile sunt urmărite, microscopic, în exsudatul fibrinos de pe suprafața splinei sau tunicii vaginale a testiculului, pe amprente colorate Machiavello, Giemsa sau imunofluorescent. Rickettsia izolată la cobai sau șoarece este adaptată ușor la cultivarea în sacul vitelin al embrionului de găină în vederea preparării unui antigen corpuscular, care se identifică prin reacții cu seruri imune de referință (RFC, microaglutinare, microimunofluorescență — tabelul 37.3).

Cobaii care nu prezintă semne de boală sau care supraviețuiesc bolii febrile sunt testați serologic, după 3—4 săptămâni de la inoculare, pentru apariția anticorpilor antirickettsieni (tabelul 37.3 și 37.2.).

Rochalimaea quintana se izolează din sânge prin însămânțare pe geloză special îmbogățită cu 6% ser de cal inactivat 30 minute la 56°C și 4% eritrocite de cal lizate. După 12—14 zile de incubare la 37°C în atmosferă cu 5% CO_2 apar microcolonii (examinare sub stereomicroscop) în care organismul este identificat microscopic pe frotiuri colorate prin tehnica Giménez și antigenic prin RFC cu ser imun specific anti-*Ro. quintana*.

37.2.2. Diagnosticul serologic

37.2.2.1. Metodele nespecifice

Metode nespecifice: reacțiile de aglutinare cu antigeni *Proteus* OX (tabelul 37.3).

Reacția Weil-Felix este o reacție de aglutinare în tub. Se pozitivează la sfârșitul primei săptămâni de boală. Titrul aglutininelor ajunge maxim la începutul convalescenței și scade la valori ne semnificative în interval de la una până la câteva luni după boală, fără reacții anamnestică în rickettsiozele de recidivă. Semnificative pentru diagnostic sunt titrurile care cresc de cel puțin 4 ori în evoluția bolii. Spre exemplu, în tifosul exantematic de primoinfecție titrul aglutininelor anti-*Proteus* OX19 poate fi de 1:500 la sfârșitul primei săptămâni de boală și crește până la 1:10 000 în convalescență.

Reacția Kudike-Steuer este o reacție orientativă prin aglutinare pe lamă. Pe o lamă de microscop se depune o picătură din sângele de examinat și se defibrinează prin mișcări circulare cu colțul altei lame. Pe picătura de sânge uscat se depune o picătură din suspensia de *Proteus* OX19. Aglutinarea suspensiei în interval de maximum 10 minute indică o reacție suspectă (corespunde unui titru de cca 1:250 la aglutinarea în tub) și trebuie confirmată prin reacții specifice.

37.2.2.2. Metodele specifice

Metode specifice: reacțiile cu antigeni rickettsieni.

■ *Reacția de fixare a complementului* este larg utilizată. Uzual se utilizează *antigenul rickettsian total*. Anticorpilor fixatori de complement apar la sfârșitul primei săptămâni de boală, ating un maxim în săptămâna a 3-a sau a 4-a de boală și persistă, la titruri reduse, luni sau ani după vindecare. Sunt semnificative titruri peste 1:16, când cresc de cel puțin 4 ori în evoluția bolii.

Pentru diagnosticul febrei Q în formele acute se folosește antigenul de *C. burneti* în *faza II*. Se urmăresc anticorpilor fixatori de complement, care sunt decelați din ziua 8—10 de boală și urmează o dinamică similară celorlalte rickettsioze. Semnificative pentru diagnostic sunt titruri de 1:8—1:16 cu condiția creșterii de cel puțin 4 ori în cursul bolii.

Urmărirea prin RFC a anticorpilor IgM permite stabilirea precoce a diagnosticului rickettsiozelor de primoinfecție pe probă unică de ser.

■ *Reacția de microaglutinare* folosește *antigeni corpusculari purificați*. Este mai sensibilă decât RFC. Curba aglutininelor evoluează paralel cu cea a anticorpilor fixatori de complement.

Endocardita cu *Coxiella* trebuie suspectată la pacienți cu hemoculturi repetate negative și titruri peste 1:200 în microaglutinarea cu *antigenul în faza I*.

■ *Reacția de hemaglutinare indirectă* decelează anticorpi din ziua a 4-a de boală. Titrul lor crește timp de 3 săptămâni până la 1:32 000 — 1:64 000, după care scade până la valori ne semnificative (<1:1 000) în intervalul de 3 luni de la debutul bolii. Deci reacția de hemaglutinare pasivă este foarte utilă în regiunile endemice, pentru că un rezultat pozitiv indică imbolnăvirea recentă și este mult mai ușor de interpretat decât rezultatele RFC sau reacției de microaglutinare.

■ *Reacția de imunofluorescență indirectă* este rar utilizată. Însă depistarea prin această reacție a anticorpilor IgA anti-*C. burneti* în *fazele I și II* poate depista endocardita din febra Q.

■ *Reacțiile moderne ELISA și imunofluorescența indirectă cu antigen Coxiella burneti în faza II* depistează rapid și cu mare sensibilitate anticorpilor IgM pentru diagnosticul febrei Q pe probe unice de ser.

37.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul rickettsiozelor

■ Seruri antirickettsiene cu specificitate de grup și de specie sau serovar pentru identificarea izolatelor în laboratoarele de referință.

■ Antigeni *Proteus* OX pentru reacția Weil-Felix și Kudicke-Steuer.

■ Antigeni rickettsieni totali cu specificitate de grup pentru RFC.

■ Antigen rickettsian solubil pentru sensibilizarea hematiilor în reacția de hemaglutinare indirectă.

■ Antigeni rickettsieni corpusculari pentru reacțiile serologice cu specificitate de specie: RFC, microaglutinare, imunofluorescență indirectă.

■ Antigen *Coxiella burneti* faza II pentru RFC.

■ Antigen corpuscular *Coxiella burneti* faza I pentru serodiagnosticul endocarditelor subacute din febra Q.

■ Truse ELISA pentru depistarea anticorpilor IgM anti-*C.burneti* faza II.

■ Vaccinuri anti-*R.prowazekii* (inactivat sau, mai imunogen, viu atenuat) și anti-*Coxiella burneti* (extract antigenic din suspensia de *C.burneti* faza I).

■ Antibiotice antirickettsiene: tetraciline, cloramfenicol.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE CHLAMIDII

38.1. DATE GENERALE

38.1.1. O minidefiniție

Chlamidiile sunt minuscule bacterii cocoide, parazite energetic, total dependente de ATP-ul oferit de celula gazdă, dar capabile de biosinteze proprii. Nu cultivă pe medii artificiale. Se reproduc într-un ciclu complex în care identificăm: forma infectivă extracelulară, corpul elementar cu diametrul de 200—300 nm și perete gros, endocitată de celula gazdă, unde se transformă în forma vegetativă, corpul reticulat. Acesta crește până la 600—1000 nm în diametru și se divide repetat, formând microcolonii (incluziuni citoplasmice) în care corpii reticulați se maturează în noi corpi elementari eliberați prin liza celulei gazdă (figura 38.1).

38.1.2. Repere taxonomice

Ordinul *Chlamydiales* cuprinde o singură familie, *Chlamydiaceae*, care are un singur gen, *Chlamydia* cu trei specii: *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci* și *C. pneumoniae*, diferențiate unele de altele prin structura ADN (homologie interspecifică sub 10%), aspectul corpurilor elementari, al incluziunilor, sensibilitatea la sulfamide, gazdele naturale, patogenitatea (tabelul 38.1) și antigenic.

38.1.3. Habitat

Chlamidiile habitează trei nișe ecologice: omul, păsări și mamifere.

Parazite ale omului sunt: *C. trachomatis* (exceptând biovarul murin, unul din cele 3 biovaruri ale speciei) și *C. pneumoniae*.

Chlamydia psittaci parazitează păsări, mamifere și numai accidental omul.

38.1.4. Factori de patogenitate

Adezinele identificate pe corpi elementari diferă cu specia și biovarul de *Chlamydia*, iar receptorii și mecanismul adeziunii, cu celulele receptoare.

Tabelul 38.1. Caractere diferențiale între speciile genului *Chlamydia*

Caracterul	<i>C.trachomatis</i>	<i>C.psittaci</i>	<i>C.pneumoniae</i>
Incluziuni:			
■ morfologia	Uzual unice cu CE ușor vizibili	Uzual multiple cu CE mascați prin densitatea matricii	Incluzii rare cu CE distincți
■ conținutul de glicogen	Da	Nu	Nu
CE, morfologia	Sferici, denși cu spațiul periplasmic îngust	Sferici, denși cu spațiul periplasmic îngust	Pleomorfi, mai ales piriformi, cu spațiul periplasmic larg
Sensibilitatea la sulfamide	Da	Nu	Nu
Gazde principale	Omul	Păsări, mamifere	Omul
Sindroame principale	Infecții oculare și ale căilor genitale, în principal localizate	Mai ales generalizate cu implicarea: pulmonilor, articulațiilor, sistemului nervos central, placentei, intestinului	Infecții respiratorii

După endocitare, corpii elementari, ca și proteinele izolate din învelișul lor, inhibă fuziunea fagozomului cu lizozomii cât timp durează ciclul replicativ al chlamidiei.

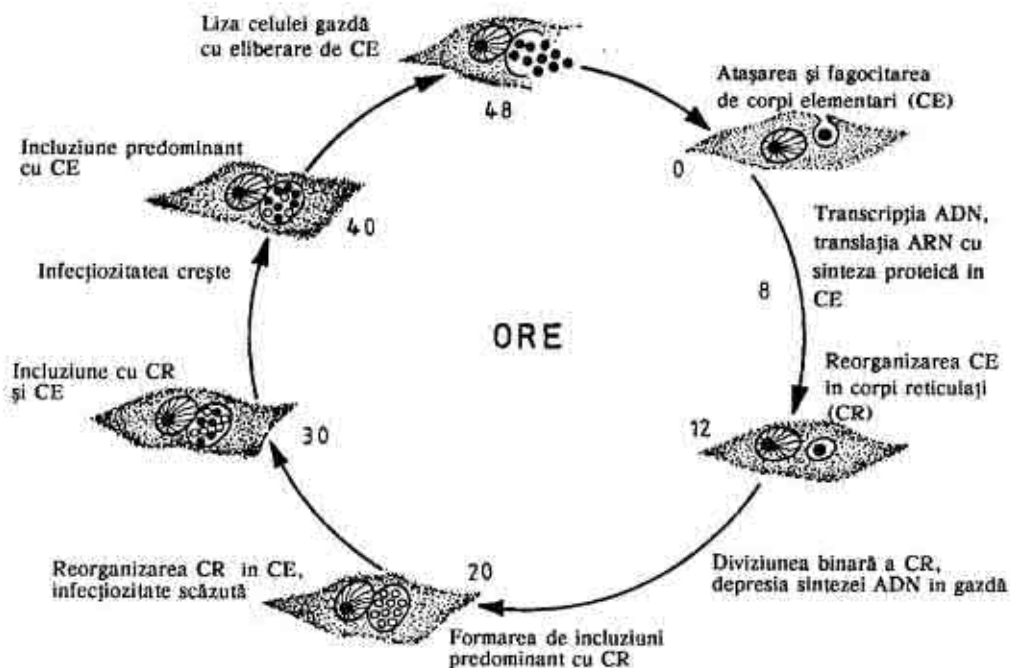


Fig. 38.1. Ciclul reproductiv al chlamidiilor (după D. Taylor-Robinson și L. Thomas, 1980)

38.1.5. Receptivitatea la infecția cu chlamidii

Receptivitatea omului la infecția cu *C.pneumoniae* și biovarurile umane de *C.trachomatis* este generală, iar față de infecția cu *C.psittaci* restrânsă numai la tulpinile aviare.

Persistența infecției chlamidiale ține, cel mai probabil, de un deficit în răspunsul imun al pacienților.

38.1.6. Infecții determinate de chlamidii

Chlamydia pneumoniae are tropism pentru căile respiratorii. Infecția, inițial o faringită, se extinde la sinusurile paranazale, la laringe și, frecvent, la căile respiratorii inferioare (bronșite, pneumonii interstițiale).

Cele două biovaruri umane de *C.trachomatis* se diferențiază prin tropismul pentru epiteliul scuamocolumnar (biovarul trahomului) sau pentru țesutul limfoid (biovarul limfogranulomatozei veneriene). Biovarul trahomului determină prin serovarurile A-C trahomul (conjunctivită foliculară gravă acută, care se cronicizează și se însoțește de panus¹) și prin serovarurile D-K conjunctivite, uretrite, cervicite cu incluziuni, iar la nou-născut conjunctivite cu incluziuni și pneumonii interstițiale. Biovarul limfogranulomatozei veneriene are trei serovaruri (L1—L3), toate cauză a acestei infecții sistemice cu transmitere sexuală.

Chlamydia psittaci determină accidental la om psitacoza, numită și ornitoză, o pneumonie interstițială cu posibilă diseminare hematogenă.

38.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN INFECȚIILE CU CHLAMIDII

38.2.1. Diagnosticul microbiologic

38.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează, în funcție de suspiciunea clinică:

■ de trahom: raclatul de pe conjunctiva tarsală superioară;

■ de conjunctivită, urerită sau cervicită cu incluziuni: raclat de pe conjunctiva tarsală inferioară, respectiv tampon endouretral (mai sensibil decât prelevarea exsudatului de la nivelul meatului uretral) sau tampon endocervical;

■ de infecții neonatale (asimptomatice, conjunctivite, pneumonii): tampon nazofaringian, care dă cele mai bune rezultate;

■ de limfogranulomatoză veneriană: puroi aspirat din bubon și la bărbați tampon endouretral, secreție obținută prin masajul prostatei, aspirat epididimar, când există epididimită acută, iar la femeie tampon endocervical, tampon sau biopsie salpingiană;

1

Panusul este o leziune corneană caracterizată prin formarea la nivelul acestui țesut a unei rețele capilare, care o prelungește pe cea conjunctivală. Duce la orbire.

■ de *pneumonii interstițiale la adult*: exsudat nazofaringian, eventual spută.

Pentru microscopia directă se efectuează extemporancu frotiuri, care sunt expediate la laborator. *Chlamydia psittaci* poate fi izolată și din probe de sânge în cazurile grave de psitacoză.

Pentru izolare, transportul probelor la laborator se face în mediu protector (e.g. SPG: zaharoză-fosfat-glutamat) adăugat cu streptomycină, vancomycină și nistatină, pentru a preveni efectele contaminării bacteriene sau fungice. Probele care nu se inoculează imediat sunt congelate la cel puțin -30°C . Refrigerarea la 4°C asigură supraviețuirea chlamidiilor doar câteva ore.

38.2.1.2. Microscopia

Microscopia este cea mai uzuală metodă de diagnostic direct al infecțiilor cu *C. trachomatis*, biovarul trahomului. Se urmărește prezența incluziunilor citoplasmice prin colorația Giemsa, colorația cu iod sau colorația imunofluorescentă.

Colorația Giemsa are sensibilitate bună pentru diagnosticul trahomului în faza acută și al conjunctivitelor neonatale. Este mai puțin satisfăcătoare pentru diagnosticul trahomului în faza cronică, a conjunctivitei, uretritei și cervicitei cu incluziuni.

Nu are valoare pentru diagnosticul limfogranulomatozei veneriene și a infecțiilor cu *C. pneumoniae* sau *C. psittaci*.

Colorația cu soluție Lugol este cel mai puțin sensibilă, pentru că glicogenul apare în matricea incluziunilor numai într-o anumită fază a ciclului evolutiv. Poate da rezultate fals pozitive din cauza prezenței glicogenului în celulele scuamoase. Are indicații pentru triajul suspensiilor în zonele cu trahom endemic.

Colorația imunofluorescentă cu anticorpi monoclonali specifici de specie este cea mai sensibilă și specifică metodă. Depistează nu numai incluziunile citoplasmice, ci și corpii elementari prezenți în exsudate sau epitelular.

38.2.1.3. Izolarea și identificarea

Izolarea și identificarea sunt accesibile numai laboratoarelor specializate.

Etapa I. Izolarea prin inoculare în culturi celulare este mai sensibilă decât inocularea în sacul vitelin al embrionului de găină. *Chlamydia trachomatis*, biovarul limfogranulomatozei veneriene, poate fi izolată ușor pe mai multe linii celulare. Izolarea celorlalte biovaruri și specii de *Chlamydia* este mai pretențioasă, pentru că necesită anumite linii celulare (e. g. linia Mc Coy sau HeLa 229) supuse unor tratamente speciale:

■ preiradiere ori pretratare cu citostatice sau adaos de cicloheximidă, pentru a inhiba replicarea celulară;

■ pretratarea cu dietilaminoetil-dextran (compus cu încărcătură electrică moleculară pozitivă, care neutralizează respingerea electrostatică între celule și corpii elementari);

■ centrifugarea inoculului pe suprafața culturii celulare, pentru a favoriza legătura adezină—receptor.

Etapa II. Incluziunile chlamidiale sunt căutate, după 2—3 zile de incubație la 35°C , prin colorația Giemsa, Macchiavello sau Giménez.

Etapa III. Confirmarea izolării se face prin pasajul în serie a incluziunilor pe culturi celulare noi. Uneori sunt necesare pasaje oarbe. Identificarea morfologică a incluziunilor

este completată cu identificarea antigenică (e. g. prin colorație imunofluorescentă cu anticorpi monoclonali).

Etapa IV. Rezultatele izolării și identificării sunt analizate, interpretate și comunicate.

Chlamydia trachomatis, biovarul *trahomului*, se izolează în proporțiile cele mai mari din probele de la pacienți cu infecții genitale și conjunctivite ale adultului, infecții neonatale, trahom activ; procentul izolărilor scade în stadiul cronic al trahomului sau în infecții oculare ușoare. Izolarea biovarului *limfogranulomatozei veneriene* ajunge la 30% în cazul probelor de puroi din bubon, dar proporția izolărilor este și mai mică din alte prelevate.

Chlamydia pneumoniae este cel mai dificil de izolat.

38.2.2. Diagnosticul imunologic

Reacția de fixare a complementului, cea mai accesibilă, folosește un antigen cu specificitate de grup. De aceea rezultatele trebuie interpretate prudent, în contextul clinico-epidemiologic. Există anticorpi de fond din cauza contactelor frecvente cu *C. trachomatis*. Semnificativă este creșterea de cel puțin 4 ori a titrului anticorpilor în proba de ser tardiv. Particulară limfogranulomatozei veneriene este evoluția latentă prelungită, care face frecvent inoperant criteriul dinamicii semnificative a anticorpilor. Titruri mai mari sau egale cu 1:64 într-o probă de ser pot confirma limfogranulomatoza veneriană în context clinic sugestiv.

Reacția de microimunofluorescență este serovar-specifică și mai puțin accesibilă. În schimb este mai sensibilă, permite diferențierea anticorpilor IgM, IgG serici și IgA secretori din lacrimi, secreții și exsudate din alte localizări ale infecției. Depistează, mai frecvent decât RFC, anticorpi de fond anti-*C. trachomatis*. Criterii de semnificație clinică sunt: depistarea anticorpilor IgM, seroconversia sau creșterea mai mult de 4 ori a titrului în serul tardiv.

Intradermoreacția Frei, care depistează o sensibilizare de tip întârziat (revedi partea întâi tabelul 11.1), este tot mai puțin utilizată pentru diagnosticul limfogranulomatozei veneriene, pentru că poate fi pozitivă și în psitacoză sau în infecții oculogenitale cu *C. trachomatis*; uneori este fals negativă.

38.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul și tratamentul infecțiilor cu chlamidii

■ Conjugate fluorescente de anticorpi monoclonali cu specificitate de specie pentru depistarea și identificarea chlamidiilor prin microscopie directă.

■ Antigen fixator de complement pentru serodiagnostic.

■ Lame cu culturi de celule infectate cu diverse serovaruri de *C. trachomatis*, cu *C. psittaci*, *C. pneumoniae* sau antigeni ai corpurilor elementari de *C. pneumoniae* pentru reacția de microimunofluorescență.

■ Antibioticele de elecție pentru tratamentul infecțiilor cu *Chlamydia* sunt: tetraciclina (nu la copii) și eritromicina.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE MICOPLASME

39.1. DATE GENERALE

39.1.1. O minidefiniție

Micoplasmele sunt bacterii:

- delimitate numai de o membrană trilaminată și lipsite de perete celular rigid ca și de informația genetică necesară sintezei precursorilor specifici peretelui;

- independente de formele L bacteriene;

- foarte mici și polimorfe;

- care cultivă pe medii acelulare, iar cultura este inhibată de anticorpii specifici.

Se înmulțesc într-un ciclu care include, alternativ, elongarea și fragmentarea unor forme filamentoase în forme cocoide și diviziunea acestora (figura 39.1).

Sunt rezistente la inhibitorii ai sintezei peretelui bacterian (e. g. peniciline).

39.1.2. Repere taxonomice

Sub denumirea generică și comună de micoplasme înțelegem, de fapt, un întreg ordin, *Mollicutes*, care cuprinde patru familii, dintre care singura cu interes medical demonstrat este familia *Mycoplasmataceae*. De aceea și noi, în acest capitol, vom restrânge sfera denumirii comune de micoplasme la familia *Mycoplasmataceae*, care are două genuri: *Mycoplasma* și *Ureaplasma*. Pentru simplificare vom reține numai că principala diferență dintre *Mycoplasma* și *Ureaplasma* este capacitatea celor din urmă de a utiliza ureea ca sursă de energie.

39.1.3. Habitat

Din cele aproape 80 de specii de *Mycoplasma*, găzduite de cele mai diverse vertebrate, omul găzduiește numai 10 specii din care doar trei sunt patogene (tabelul 39.1).

Dintre cele 3 specii de *Ureaplasma*, una singură, *U. urealyticum* este găzduită în căile urogenitale, canalul anal și cavitatea bucală.

Tabelul 39.1. Specii de *Mycoplasma* găzduite de om

Specia	Habitat	Patogenitatea
<i>M.buccale</i>	Orofaringe	--
<i>M.faucium</i>	Orofaringe	--
<i>M.fermentans</i>	Tractus urogenital inferior	--
<i>M.genitalium</i>	Tractus urogenital inferior	+
<i>M.hominis</i>	Tractus urogenital inferior	+
<i>M.lipophilum</i>	Nazofaringe	--
<i>M. orale</i>	Orofaringe	--
<i>M.pneumoniae</i>	Căi respiratorii	+
<i>M.primatum</i>	Cavitatea bucală; tractus urogenital inferior	--
<i>M.salivarium</i>	Orofaringe	--

39.1.4. Factori de patogenitate

Adezinele fixează micoplasmele virulente pe acidul sialic din glicoproteinele membranare ale gazdei. Rol de adezină la *M.pneumoniae* îl are proteina P1 aglomerată în «bonetă» la extremitățile formelor filamentoase. La *M.genitalium* și alte micoplasme adezina apare dispusă tot la extremități, dar ca spiculi asemănători cu ai mixovirusurilor. Adezivitatea unor micoplasme patogene se reflectă direct în capacitatea lor de hemadsorbție (fixarea hematiilor pe suprafața micoplasmelor).

Contactul intim al micoplasmelor cu membrana citoplasmică favorizează schimburi moleculare reciproce, care prejudiciază celula gazdă. Astfel *M.pneumoniae* inhibă catalaza celulei gazdă. De aici decurge peroxidarea lipidelor membranare cu efecte citotoxice directe: ciliostază, cilionecroză, exfolierea epitelului respirator urmată de un proces inflamator acut.

Determinanți antigenici comuni ai micoplasmelor cu antigeni tisulari declanșează răspunsuri autoimune: e. g. comunitatea antigenică între *M.pneumoniae* și creierul sau pulmonul uman, hematii etc.

În fine, unele micoplasme induc transformarea blastică a limfocitelor și pot produce efecte citotoxice prin răspuns imun celular.

39.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu micoplasme

Receptivitatea la infecțiile cu *M.pneumoniae* este generală.

Mycoplasma hominis, *M.genitalium* și *Ureaplasma urealyticum* sunt organisme condiționat patogene. Portajul lor apare postnatal, ca urmare a contaminării în canalul de naștere, scade semnificativ până la pubertate, pentru a crește postpubertar prin transmitere sexuală. Deficiențe locale ale apărării antiinfecțioase a tractusului urogenital deschid calea infecției cu aceste specii (e. g. infecții post-abortum, post-partum). La pacienți imunodeficienți și alte micoplasme comensale își pot manifesta potențialul patogen.

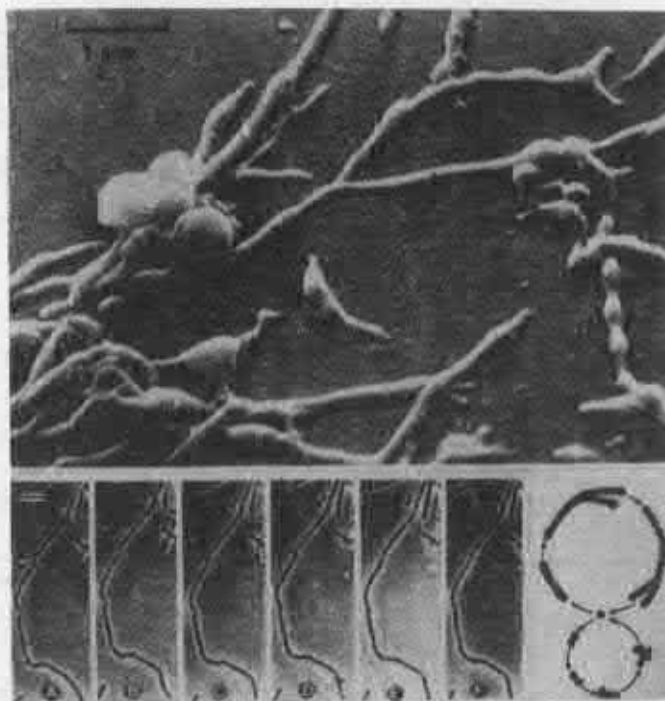


Fig. 39.1. *Mycoplasma pneumoniae*, microscopie electronică a culturii în vârstă de 6 zile; observați: filamente ramificate, lanțuri de elemente cocoide și celule cu extremități balonizate (sus). *M. hominis*, cinematografiere în contrast de fază a culturii; începând de la A, intervalele în minute sunt: 2,8 (B); 3,3 (C); 4,8 (D); 5,3 (E); 5,5 (F); observați fragmentarea filamentelor în forme cocoide; markerul este egal cu 10 m (jos stânga). Reprezentare schematică a înmulțirii micoplasmelor prin fisiune binară sau elongare în forme filamentoase, ramificarea și fragmentarea acestora în forme cocoide (jos dreapta, după *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986)

39.1.6. Infecții cu micoplasme

Infecția căilor respiratorii cu *M. pneumoniae* poate evolua inaparent sau cu grade variate de afectare: de la nazofaringite și bronșite până la pneumonii interstițiale. Mecanismele și durata imunității sunt puțin cunoscute. Reinfecții sunt posibile și au, de cele mai multe ori, manifestări mai zgomotoase datorită, probabil, reacțiilor de sensibilizare. Copiii până la 5 ani fac cel mai frecvent infecții inaparente sau un simplu catar respirator. Infecția la vârste între 5 și 20 de ani evoluează în proporție mai mare de 70% pneumonic. Complicații apar prin extinderea infecției la urechea medie, sinusurile paranazale și pleură sau prin reacții de sensibilizare (anemii hemolitice, ectodermoza pluriorificială, encefalită sau polinevrită). Însuși procesul pneumonic determinat de *M. pneumoniae* pare mai mult expresia unei reacții de sensibilizare decât a infecției propriu-zise.

Mycoplasma hominis și *M. genitalium* determină inflamații pelvine (e. g. salpingite, abcese tuboovariene etc.), febre post-abortum sau post-partum, unele pielonefrite.

Ureaplasma urealyticum determină uretrite nongonococice și uretroprostatite. Cauză a unor uretroprostatite poate fi și *M. hominis*, dar probele în acest sens sunt insuficiente.

39.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU MICOPLASME

39.2.1. Diagnosticul microbiologic

Numai puține laboratoare au experiența și dotările necesare cultivării și identificării micoplasmelor, rezultatele, de multe ori, fiind tardive.

39.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează, în funcție de localizarea infecției, sputa sau exsudatul nazofaringian; exsudat uretral, secreție după masajul prostatei; urină; prelevate prin laparoscopie pelvină sau intraoperatorii (e. g. exsudat din trompele uterine, puroi din abcese, exsudat peritoneal), raclatul mucoasei uterine.

39.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă este fără valoare: colorațiile uzuale nu pot depista micoplasmel din cauza dimensiunii lor reduse, iar colorația imunofluorescentă nu a dat rezultate satisfăcătoare.

39.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Izolarea micoplasmelor este favorizată de un inoculum bogat, însământat imediat după prelevarea probelor atât într-un mediu difazic, cât și pe unul agarizat.

Micoplasmel cultivă numai pe medii complexe îmbogățite cu ser de cal și extract de levură la care se adaugă, drept sursă de energie, glucoză, pentru micoplasmel, sau uree, pentru *Ureaplasma*, și roșu fenol ca indicator de pH. Acetatul de taliu (500 $\mu\text{g/ml}$), penicilina G (1000 UI/ml) și amfotericina B (5 $\mu\text{g/ml}$) previn invadarea mediului de către microorganisme contaminante cu creștere rapidă. Mediile pentru *U.urealyticum* și *M.genitalium* se prepară fără acetat de taliu, care inhibă aceste micoplasmel.

Micoplasmel cu habitat uman, la izolarea din organism, sunt preferențial anaerobe. Culturile sunt incubate la 37°C în atmosferă cu 95% azot și 5% CO₂.

Etapa II. Cel puțin 3 zile de incubație, uneori și 14—21 zile, sunt necesare pentru a observa creșterea micoplasmelor:

■ Placa cu mediu agarizat se urmărește sub stereomicroscop (25X—100X), pentru a observa apariția *microcoloniilor* de *Mycoplasma*, cu diametrul de 90—500 μm , sau de *Ureaplasma*, cu diametrul de numai 15—60 μm .

■ În mediul difazic virajul indicatorului roșu fenol în domeniul acid (fermentarea glucozei de către *M.pneumoniae* sau *M.genitalium*) sau alcalin (scindarea ureei de către *Ureaplasma*) este semnificativ abia după 3—5 zile. Virajul culorii în primele 48 ore este cauzat de contaminanți bacterieni.

Etapa III. În primoculturi pe mediu agarizat minusculele colonii de micoplasmel pot fi confundate cu pseudocolonii formate de resturi celulare din inoculum, iar virajul mediului difazic poate avea și alte cauze. De aceea izolarea micoplasmelor trebuie confirmată prin:

■ *Replicare pe mediu agarizat.* Numai coloniile de micoplasmel generează colonii asemănătoare: microcolonii cu centrul dens, opac, granular, încadrat în mediu și periferia transparentă — aspect de «ou prăjit» (figura 39.2).

Tabelul 39.2. Teste pentru identificarea micoplasmelor izolate de la om

Testul	<i>M.pneumoniae</i>	<i>M.genitalium</i>	<i>M.hominis</i>	<i>M.buccale</i>	<i>M.faucium</i>	<i>M.fermentans</i>	<i>M.lipophilum</i>	<i>M.orale</i>	<i>M.primatum</i>	<i>M.salivarium</i>	<i>U.urealyticum</i>
Creștere lentă anaerobă	+		+	-	-	-	-	-	-	-	+
Diametrul coloniilor, μm											
$\geq 90-100$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15-60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
pH optim pentru cultivare											
7,3-7,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6,0-6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentarea glucozei	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Scindarea ureei ^{1,2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Argininhidrolază	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Reducerea tetrazolului ^{1,3}	+		-	-	-	-		-	-	-	-
Hemadsorbția eritrocitelor de cobalt ^{1,4}	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

¹ Se efectuează inundând cu reactivul suprafața mediului de cultură agarizat.
² Soluția de clorură de mangan colorează coloniile de *U.urealyticum* în auriu-brun datorită depunerii de bioxid de mangan la aceste niveluri.
³ Soluția clorurii de 2-(p-iodofenil)-3-nitrofenil-5-feniltetrazoliu colorează în roșu coloniile de *M.pneumoniae*, care reduc compusul la formazan.
⁴ Suspensie 0,4% eritrocite de cobalt în bulion nutritiv pentru micoplasme.

■ **Colorația Dienes:** coloniile de micoplasme se colorează în violet și, acoperite cu o lamelă, pot fi examinate cu imersia.

Identificarea izolatelor se face prin: *caracterele de cultivare, fermentarea glucozei, scindarea ureei, hidroliza argininei, reducerea tetrazolului, hemadsorbția eritrocitelor de cobalt* (tabelul 39.2), precum și *inhibarea creșterii prin seruri imune specifice* (în jurul rondelilor impregnate cu antiserul corespunzător apare o zonă de inhibiție a creșterii).

Etapa IV. Se înregistrează, se interpretează și se comunică rezultatele izolării și testelor de identificare. Infecțiile cu *U.urealyticum* sunt diagnosticate corect numai dacă izolarea este cantitativă sau semicantitativă: izolarea în cantități mari are semnificație clinică; izolarea în cantități mici poate fi nesemnificativă (specie comensală).

39.2.2. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic al infecțiilor cu *M.pneumoniae* este accesibil curent laboratoarelor clinice. Se titrează «aglutininele la rece» pentru hematiile umane de grup O sau, cu rezultate mai precise, anticorpii specifici anti-*M.pneumoniae*.

Numerul o parte din pneumoniile cu «hemaglutinine la rece» sunt cauzate de

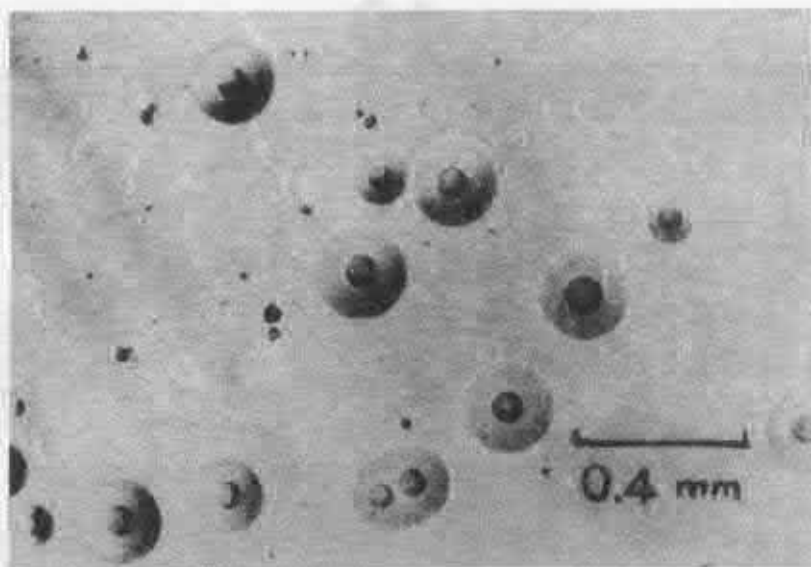


Fig. 39.2. Colonii de *Mycoplasma* sp. în vârstă de 4 zile. Apare evident aspectul de «ou prăjit» (după S. Razin și O. Olivier, 1961)

M.pneumoniae, iar la cca 50% din persoanele infectate cu *M.pneumoniae* nu depistăm acești anticorpi. Totuși, pneumonia pacienților la care depistăm titruri de cel puțin 1:128 este cauzată de *M.pneumoniae*.

Pentru titrarea anticorpilor specifici anti-*M.pneumoniae* cea mai accesibilă este RFC, dar tehnica are o sensibilitate mediocră și depistează creșterea semnificativă a titrului anticorpilor numai la 50—80% din pacienți. ELISA este mult mai sensibilă, diferențiază anticorpii IgG de cei IgM și permite deci stabilirea diagnosticului mai precoce pe o probă unică de ser. Alte reacții sensibile cum sunt testul de inhibiție a creșterii sau testul micoplasmaciului au accesibilitate foarte redusă.

Diagnosticul serologic în infecții cu alte micoplasme are valoare practică redusă: anticorpi fixatori de complement sunt depistați doar la 50% din persoanele infectate. Reacția de hemaglutinare indirectă este mai sensibilă, fără a satisface însă complet exigențele diagnosticului.

39.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul infecțiilor cu micoplasme

- Seruri imune anti-*Mycoplasma*, specifice de specie, și anti-*U.urealyticum* pentru testul de inhibiție a creșterii.
- Antigen fixator de complement *M.pneumoniae*.
- Truse ELISA pentru dozarea anticorpilor IgM și IgG anti-*M.pneumoniae*.
- Antibiotice pentru tratamentul infecțiilor cu micoplasme: tetraciline, eritromicină.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MICOZELOR

40.1. DATE GENERALE

40.1.1. O minidefiniție

Fungii (lat. *fungus* = ciupercă) sau micetele (gr. *mykes* = ciupercă) sunt organisme multinucleate, cu nuclee de tip eucariot dispersați într-un cenocit (gr. *koinos* = comun, masă citoplasmică continuă, multinucleată) micelial lipsit de pigmenți fotosintetici, delimitat de o membrană bogată în steroli și acoperit cu un perete celular polizaharidic (hemiceluloze, chitină).

40.1.2. Repere taxonomice

Alături de bine cunoscutele ciuperci, fungii reunesc și microorganisme: mucegaiurile și levurile.

Clasificarea și identificarea fungilor se bazează în principal pe morfologia și modul lor de reproducere. Activitatea biochimică este studiată mai ales pentru identificarea levurilor.

40.1.2.1. Morfologia fungilor microscopici

Mucegaiurile sunt constituite din filamente ramificate numite *hife*. Cele mai multe mucegaiuri au hife septate prin pereți transversali. Fragmentarea hifelor în lanț de celule este numai aparentă, pentru că, septurile fiind perforate, întregul organism rămâne un cenocit. Prin creștere și ramificare hifele se întreș într-un *miceliu* (figura 40). Miceliul e constituit din două părți: *miceliul vegetativ*, care crește în substratul de unde absoarbe substanțe nutritive, și *miceliul aerian*, care crește erect deasupra substratului și produce *organe de fructificare purtătoare de spori caracteristici*. Diametrul hifelor variază, în funcție de specie, între 1—2 și 10—20 μm , iar lungimea lor variază larg, în funcție de condițiile creșterii. Coloniile mucegaiurilor sunt mase miceliene păsloase, pufoase, care, după dezvoltarea sporilor, se pot pigmenta.

În ciuda aspectului microscopic asemănător, mucegaiurile nu sunt înrudite cu actinomicetele (vezi capitolul 41), care sunt bacterii grampozitive filamentoase, pseudo-miceliale, cu structură celulară și sensibilitate la diferite antibiotice.

Levurile sunt celule ovale sau rotunde cu dimensiuni medii de 2,5—6 μm . Prin înmugurire formează celule fiice, care, când se alungesc și rămân înlanțuite, pot lua aspect de *pseudohife* (figura 40.2). Pe medii de cultură formează colonii opace, cremoase.

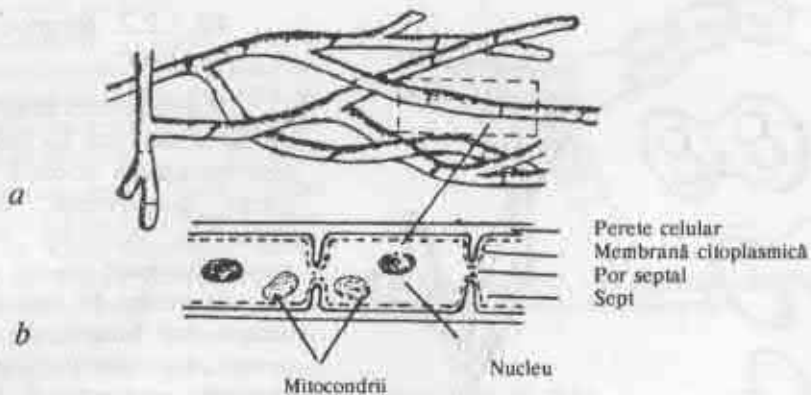


Fig. 40.1 Micelu cu hife septate (a); detaliu mărit al hifei din cartuş (b)



Fig. 40.2 O levură, *Candida albicans*, în depozitul membranos de la un pacient cu mărgărităreă (1000X). Observați levuri înmugurite și pseudohife



Fig. 40.3. Formarea unui zigospor

de pseudohife (figura 40.2). Pe medii de cultură formează colonii opace, cremoase.

Funghi dimorfi în țesuturile gazdei sau în culturi incubate la 37°C se dezvoltă ca levuri (faza tisulară sau parazitară), iar în culturi incubate la $20\text{--}26^{\circ}\text{C}$ sau în sol au dezvoltare miceliană (faza saprofită). Unii funghi patogeni sunt funghi dimorfi; pentru identificarea lor este esențial să demonstrăm conversia de la o fază la alta.

40.1.2.2. Reproducerea fungilor

Reproducerea fungilor se face sexual și asexuat. La *fungii imperfecti* înmulțirea sexuală nu a fost (încă) demonstrată. În ambele forme de înmulțire a fungilor sporularea joacă un rol important. Spre deosebire de endosporii bacterieni (cu funcție de rezistență numai), sporii fungici sunt forme de înmulțire, propagare și, numai unii dintre ei, de rezistență.

Reproducerea sexuală. Sporii sexuali se produc prin fuzionarea a două hife sau levuri, urmată de meioză. Fungii cu interes medical produc trei tipuri de spori sexuali: zigospori, ascospori și bazidiospori.

Zigosporii sunt produși de *zigomicete*: vârfurile a două hife vecine fuzionează și formează spori mari cu perete gros (figura 40.3).

Ascosporii sunt produși de *ascomicete*: fuziunea a două celule duce la formarea unui organ specializat, numit *ască*, în care se formează 4—8 ascospori (figura 40.4).

Bazidiosporii sunt produși de *bazidiomicete*: fuziunea celulelor duce la formarea unui organ măciucat, numit *bazidium*, unde se formează 4 nuclee care migrează și înmuguresc pe suprafața organului pentru a forma tot atâția bazidiospori (figura 40.5).

Înmulțirea prin simpla fragmentare a hifelor nu prezintă importanță pentru clasificarea fungilor.

Reproducerea asexuată. Sporii asexuali apar direct din celule hifale sau levurice (blastosporii, chlamidosporii și artrosporii) sau în organe specializate de fructificare

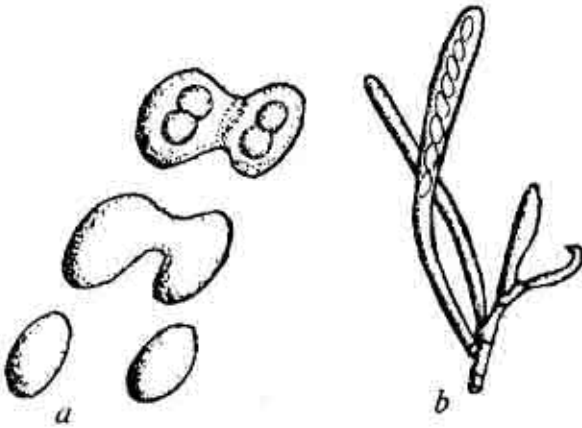


Fig. 40.4. Formarea ascosporilor: a — stadii succesive ale conjugării și formării ascosporilor la o levură; în final a apărut o ască cu 4 ascospori; b — ască matură cu 8 ascospori la un fung filamentos

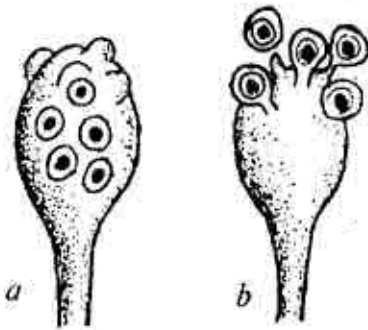


Fig. 40.5. Formarea bazidiosporilor: a — bazidium imatur cu nuclee sporale în mișcare; b — bazidiospori maturi înmuguriți pe suprafața unui bazidium

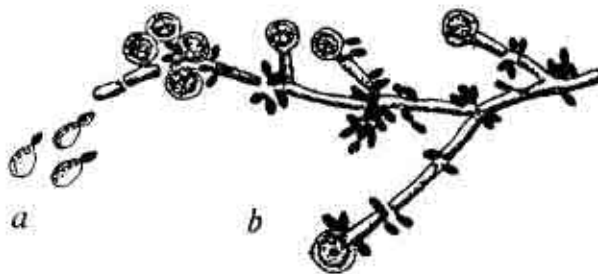


Fig. 40.6. *Candida albicans*: a — celule levurice cu blastospori; b — pseudohife cu blastospori și chlamidospori

(sporangiospori, conidii).

Blastosporii apar prin inmugurirea levurilor, a unui pseudo-miceliu sau miceliu (figura 40.6,a). Separați de celula parentală, se dezvoltă de sine stătător.

Chlamidosporii sunt spori rezistenți cu perete gros, formați prin creșterea și rotunjirea unor celule hifale (figura 40.6,b). Chlamidosporii supraviețuiesc după ce restul miceliului moare și se dezintegrează.

Artrosporii sunt spori rezistenți cu perete gros și aspect cilindric sau în butoi, formați prin segmentarea și dezarticularea în celule separate a unui filament dintr-un miceliu septat (figura 40.7).

Sporangiosporii se formează în interiorul unui sac, numit *sporangiu*, purtat în vârful unui filament septat, numit *sporangiofor* (figura 40.8).

Conidiile sunt spori asexuați formați pe *conidiofori*. Unele sunt mici, *microconidiile*, unicelulare, rotunde, eliptice sau piriforme, sesile sau pedunculate. Altele sunt mari, *macroconidiile*, obișnuit septate, măciucate sau piriforme (figurile 40.16, 40.20, 40.22).

Sporii sexuați ai fungilor și, dintre sporii asexuați, chlamidosporii și artrosporii sunt rezistenți la condiții adverse de mediu.

Astfel pe baza mecanismului și aspectelor morfologice ale sporulării de reținut sunt patru diviziuni cu interes medical ale regnului *Fungi*: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* și *Deuteromycota* (vezi tabelul 40.1). Diviziunea *Deuteromycota*, care reunește fungii imperfecti, nu este o grupare filogenetică naturală, ci una artificială.

40.1.3. Habitat

Fungii sunt organisme saprofite larg răspândite în natură, unde îi găsim în sol, în materialele biodegradabile (vegetale, furaje, cereale, lemn, dejecte), pe învelișurile omului și animalelor. Specii de *Candida* sunt normal găzduite în gură, orofaringe, colon, vagin. Unii fungi dermatofiti sunt antropofili, dar specii zoofile sau geofile pot infecta ocazional omul.

Dintre miile de specii ale fungilor numai cca 100 determină îmbolnăviri (tabelul 40.1).

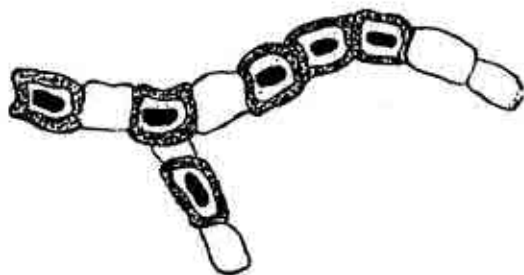


Fig. 40.7. Miceliu septat. Prin segmentarea hifelor apar artrospori cu perete gros, alternând cu celule goale



Fig. 40.8. *Rhizopus*, un zigomicet. Observați sporangioforul cu sporangiu și sporangiospori

1

În nomenclatura fungilor sufixele *-mycota* desemnează diviziunea, *-mycotina* subdiviziunea, *-mycetes* clasa, *-mycetidae* subclasa, *-ales* ordinul, *-aceae* familia.

Tabelul 40.1. Fungi microscopici cu importanță medicală: taxonomie, infecții determinate și diagnosticul lor

Diviziuni genuri/specii	Infecții determinate/factori predispozanți	Prelevate indicate	Izolare-identificare	Diagnostic serologic
<i>Ascomycotina</i>				
<i>Saccharomyces</i>	Levuri utilizate în: panificație, fabricarea berei. La <i>diabetici</i> poate determina: mărghăritărei, vulvovaginite, colonizări și infecții urinare	Exsudat de la nivelul mucoasei lezate; urină	Geloză-sânge sau Sabouraud + antibiotice. Levuri inmugurite. Formează asce cu 4 ascospori	—
<i>Microsporium</i> (<i>Nannizzia*</i>) <i>Trichophyton</i> (<i>Arthroderma*</i>)	Infecții primare contagioase favorizate de promiscuitate și de lipsa igienei corporale. Fungi cheratolitici. Infectează: epiderma (inclusiv stratul granulos), părul (inclusiv foliculul pilos). Tricofija unghiilor	Scuame epidermice, fire de păr, raclat de pe unghii	Geloză Sabouraud + antibiotice. Caractere de cultură și microscopice	—
<i>Blastomyces</i> ² (<i>Ajelomyces*</i>) <i>Histoplasma</i> ² (<i>Emmonsii</i> *)	Infecții primare pulmonare cu diseminare hematogenă. Alte porți de intrare (e. g. cutanată) rar implicate	Spută, puroi; sânge, măduvă osoasă	Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice ³ ; incubare la 25° și 37°C. Mediu difazic Morfologia formei levurice și filamentoase. Inducția formei levurice	ID, RFC, RFC, ID, CIE, LA, i.d.r.
<i>Emericella</i> <i>Petridium</i>	Eumicetoame consecutive plăgilor înțepate cu așchii de lemn sau spin	Puroi, probe tisulare bioptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ² . Caractere de cultură și microscopice	—
<i>Basidiomycotina</i>				
<i>Cryptococcus neoformans</i> , (<i>Filobasidiella neoformans*</i>)	Infecții mai frecvent pulmonare, aparente sau inaparente; diseminări hematogene: meningite, abcese. Ocazional, cheratite și uretrite. Factori predispozanți: neoplasme, leucemii, terapie imunosupresivă sau -depresivă, infecția cu HIV. Traumatisme corneene; uretrite postgonococice	Spută, puroi, L. C. R., exsudate	Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice ¹ . Caractere microscopice și de cultură. Producere de fenoloxidază	AT, LA IFI

<i>Zygomycotina</i>				
<p><i>Mucorales:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Absidia</i>, ■ <i>Mucor</i>, ■ <i>Rhizopus</i> 	<p>Mucormicoze. Infecții acute, necrotice, rapid mortale: nas, sinusuri, orbită, sistem nervos central; gastrointestinale, vasculare; infecții cutanate prin bandaje contaminate. Factori predispozanți: leucemie, acidoză diabetică, denutriție, corticoterapie, plăgi, arsuri</p>	<p>Probe tisulare bioptice sau necroptice</p>	<p>Geloză Şabouraud + antibiotice³. Caractere de cultură și microscopice</p>	<p>ID</p>
<p><i>Entomophthorales:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Basidiobolus</i> ■ <i>Conidiobolus</i> 	<p>Entomoftromicoze: la copilul mic infecții subcutanate ale membrelor; la adult infecții nazale. Factori predispozanți: vezi la mucormicoze</p>	<p>Probe tisulare bioptice sau necroptice</p>	<p>Geloză Şabouraud + antibiotice³. Caractere de cultură și microscopice</p>	<p>ID</p>
<i>Deuteromycotina</i>				
<p><i>Blastomycetidae</i> (levuri imperfecte)</p>	<p>Infecții localizate la gazda imuno-activă: tegument, unghii, mucoase, infecții urinare; cheratite. Factori favorizanți: diabet, tratament cu antibiotice, contraceptive orale, sarcină</p>	<p>Scuame, raclatul unghiilor; exsudate, urină</p>	<p>Geloză-sânge sau Sabouraud + antibiotice³. Bulion. Levuri.</p>	<p>ID, CIE, LA</p>
<p><i>Candida</i></p>	<p>Infecții sistemice: endocardite, meningite etc. la gazda imuno-compromisă (infecția cu HIV, neoplazii, leucemie, corticoterapie, tratament citotoxic)</p>	<p>Sânge, L. C. R. (probe repetate); aspirate bronșice necontaminate</p>	<p><i>C.albicans</i> se identifică prin testul de filamentare in ser și formare de chlamidospori. Pentru alte specii este necesară auxanograma</p>	
<p><i>Malassezia furfur</i></p>	<p>Pitiriazis verzicolor, o micoză cutanată superficială. Factori predispozanți: transpirație excesivă</p>	<p>Scuame epidermice</p>	<p>Geloză Sabouraud + cicloheximidă sub strat de ulei de măsline. Levuri cu blastospori. Unele filamentează</p>	<p>—</p>
<i>Hyphomycetidae</i>				
<p><i>Coccidioides</i>² <i>Paracoccidioides</i></p>	<p>Infecții primare pulmonare cu diseminare hematogenă. Alte porți de intrare (e.g. cutanată) rar implicate</p>	<p>Spută, puroi</p>	<p>Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice³ cu incubare la 25 și 37°C. Morfologia formei levurice și filamentoase; patogenitate experimentală</p>	<p>PT, ID, RFC, LA, i.d.r. ID, CIE, RFC</p>

<i>Epidermophyton</i>	Fung cheratolitic. Infectează epiderma și unghiile. Infecții primare, contagioase, favorite de promiscuitate și lipsa igienei corporale	Scuame epidermice, raclatul unghiilor	Geloză Sabouraud + antibiotice. Caractere de cultură și microscopice	—
<i>Aspergillus</i> ⁴ (mai frecvent <i>A.flavus</i>)	Sensibilizări prin contact, inhalare, ingestia de spori, hife și metaboliți ai fungului (e. g. rinite, astm, pneumonite). Infecții cu creștere activă a fungului în țesuturi sau suprafețe (e. g. aspergilomul, aspergiloza «oportunistă»).* Factori predispozanți: caverne tuberculoase vechi, transplant de organe, neoplasme, leucemii, terapie imunosupresivă. Intoxicații alimentare	Spută, probe tisulare bioptice sau necroptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ³ . Caractere de cultură și microscopice	ID, CIE, RFC
<i>Sporotrix schenckii</i> ^{2,3}	Infecții cutaneo-limfatice consecutive ale plăgilor cauzate de înțepături prin așchii de lemn, ghimpi. La gazda imunocompromisă, rar, infecții pulmonare		Geloză Sabouraud + antibiotice cu incubare la 25 și 37°C. Morfologia formei levurice și filamentoză; conversia la forma levurică	AT, LA
<i>Alternaria</i> ⁵	Infecții ale plăgilor cutanate.	Puroi.	Geloză Sabouraud + antibiotice.	ID
<i>Cladosporium</i> ³	Infecții ale plăgilor cutanate; abcese cerebrale	Puroi, probe tisulare bioptice	Caractere de cultură și microscopice	
<i>Acremonium</i> <i>Curvularia</i> ³ <i>Exophiala</i> ³ <i>Fusarium</i> <i>Madurella</i> ș.a.	Eumicetoame consecutive ale plăgilor cauzate de înțepături cu așchii de lemn sau spini	Puroi, probe tisulare bioptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ² Caractere de cultură și microscopice	—

* Între paranteze: numele formei sexuate recunoscute.

¹ Abrevieri: AT — aglutinare în tub, CIE — contraimmunoelectroforeză, ID — imunodifuzie, i.d.r. — intradermoreacție, IFI — imunofluorescență indirectă, LA — latex-aglutinare, PT — precipitare în tub, RFC — reacție de fixare a complementului.

² Fungi dimorfi.

³ Amestecul selectiv de antibiotice recomandat este: penicilină 20 UI/ml, gentamicină 50 μg/ml, cloramfenicol 50 μg/ml și cicloheximidă 500 μg/ml. *Cryptococcus neoformans*, cele mai multe zigomicete, *Aspergillus* și alți fungi filamentozși sunt foarte sensibili la cicloheximidă. Unele tulpini de *Histoplasma capsulatum* sunt sensibile la concentrațiile mari de cloramfenicol și gentamicină utilizate pentru selecție. De aceea însămânjarea se face și pe medii fără cicloheximidă, iar prelevatele necontaminate se însămânjează numai pe medii fără antibiotic.

⁴ Există specii de *Aspergillus* cu reproducere sexuată recunoscută (e. g. *Aspergillus nidulans* a cărui formă sexuată se numește *Emericella nidulans*, un ascomicet).

⁵ Familia *Dematiaceae*. Fungii dematiacei formează un pigment brun-măsliniu până la negru în pereții hifelor, ai conidilor sau ambelor.

40.1.4. Factori de patogenitate

Puțini fungi sunt patogeni primari (e. g. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* ș. a.). Majoritatea speciilor care îmbolnăvesc omul sunt organisme condiționat patogene (oportuniste). Factorii de patogenitate ai acestor microorganisme variază cu specia:

- Capacitatea de a supraviețui și multiplica în macrofagele normale (e. g. *Histoplasma*, *Blastomyces*).
- Capacitatea de a se multiplica pe seama cheratinei din epidermă și fanere (e. g. fungii dermatofii).
- Capacitatea de a se înmulți când pătrund în țesuturi lipsite de apărare antiinfecțioasă sau cu apărarea antiinfecțioasă compromisă (e. g. variați fungi oportuniști).
- Capacitatea sensibilizantă a fungilor imprimă particularități formei clinice a unor micoze (e. g. candidoze, dermatofii) sau determină pneumonite alergice după inhalarea sporilor (e. g. *Aspergillus* sp).
- Elaborare de micotoxine: e. g. aflatoxinele produse de *Aspergillus flavus* sau alte specii de *Aspergillus*.

40.1.5. Micoze și receptivitatea la micoze

Deosebim situația gazdei normoreactive și a gazdei cu apărarea antimicrobiană compromisă.

Gazda normoreactivă. Micete din microflora normală a organismului, în condiții de disbioză, pot determina micoze superficiale, localizate, ale tegumentului sau mucoaselor (e. g. *Malassezia furfur*, *Candida albicans*).

Fungii dermatofii (*Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*) determină dermatofii cu variate localizări, mai ales în condiții precare de igienă corporală. În antichitate cauza acestor leziuni era considerată larvele unor molii, insecte pe care romanii le numeau *Tinea*. În acest concept își are originea denumirea dermatofiiilor, preferată de mulți dermatologi: *tinea pedis* (a piciorului), *tinea corporis* (a pielii glabre), *tinea cruris* (a regiunii inghinale), *tinea unguium* (a unghiilor) sau pilomicoze ca *tinea capitis* (a scalpului), *tinea barbae* (a bărbii). *Favusul* este o pilomicoză determinată de *Trichophyton schoenleinii*, care invadează epiderma mai profund și, în lipsa tratamentului, duce la alopecie.

Receptivitatea la dermatofiiile determinate de *Microsporum* dispare la pubertate.

Fungii dimorfi patogeni (*Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*) determină infecții primare, uzual aerogene, care evoluează inaparent sau ca infecții respiratorii diseminate sistemic cu leziuni granulomatoase în variate organe. Chiar după vindecarea acestor leziuni, infecția rămâne latentă.

Micetoamele sunt infecții cronice locale, progresiv distructive ale pielii, țesutului subcutanat, musculoaponevrotic și osos determinate de fungi (*eumicetoame*) sau de *actinomicete* (*actinomicetoame* — vezi capitolul 41), care pătrund printr-o plagă (mai frecvent a piciorului sau mâinii determinată de spini sau așchii de lemn). Clinic se manifestă ca o tumefiere care conține granuloame supurative cu multiple fistule, prin care se scurge puroi cu granule micotice de culori variate (colonii tisulare ale agentului etiologic). Eumicetoame determină unele ascomicete ca *Emericella*, *Petriedium* sau deuteromicete ca *Madurella* ș. a. (tabelul 40.1).

Gazda cu apărarea antiinfecțioasă compromisă în diferite grade. Diabetul zaharat,

prin prezența glucozei în secreții și excrete, favorizează infecția mucoaselor nu numai cu *Candida albicans*, ci și cu levuri uzual nepatogene cum sunt specii de *Saccharomyces* (drojdia de panificație, de bere).

Plăgile înțepate cu așchii vegetale sau spini deschid calea cheraților micotice și micozelor subcutanate (limfadenite, eumicetoame).

Imunodeficiențele celulare (medicație imunosupresivă, infecție cu virusul imunodeficienței umane) determină reactivarea și evoluția fatală a histoplasmozei, blastomicozei, coccidioidomicozei și favorizează *infecțiile sistemice cu fungi oportuniști* (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, mucegaiuri).

40.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU LEVURI

Mai frecvente sunt candidozele determinate de *C.albicans*. La gazda imunocompromisă pot evolua infecții sistemice determinate de *C.albicans* (ocasional alte specii) și de *Cryptococcus neoformans*.

40.2.1. Diagnosticul microbiologic

40.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de localizarea infecției se prelevă:

1. În *infecțiile superficiale* (în majoritate candidoze, dar cherațite și uretrite cu *Cryptococcus neoformans* sunt posibile):

- tamponare din depozitul leziunilor de mângăritărel de pe mucoasa bucală, orofaringiană, vaginală;

- raclat din leziunile cutanate (mai frecvent intertrigo — inflamația pliurilor cutanate);

- raclat din leziunile corneene;

- spută sau aspirat bronșic transtraheal ori bronhoscopic (necontaminat);

- urină (probe curate prinse în zbor din jet mijlociu sau, mai indicat, aspiratul suprapubian pentru a elimina contaminarea probei cu levuri comensale uretrovulare);

- exsudat uretral;

- fecale.

2. În *infecții sistemice*:

- hemoculturi repetate în endocarditele subacute;

- lichid cefalorahidian (probe repetate de minimum 5 ml);

- probe tisulare bioptice sau necroptice.

40.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă orientează diagnosticul către infecția cu levuri și, prin aceasta, tratamentul antimicrobian. Semnificația clinică a levurilor observate în prelevate necontaminate este certă; a celor observate în prelevate contaminate trebuie însă atent evaluată.

Prelevatele fluide se *examinează ca atare între lamă și lamelă*. Prelevatele vâscoase (spută, fecale), raclatul epidermic sau al unghiilor, al secțiunii tisulare fine, trebuie în prealabil clarificate. Pentru aceasta se suspensionează proba pe lama de microscop într-o picătură din soluția 10—20% KOH (în raport cu opacitatea probei) cu 10% glicerol. Se

acoperă cu lamela, pe care o presăm ușor, pentru a obține o peliculă cu grosime uniformă și se lasă preparatul 15—20 minute în cameră umedă pentru clarificare. La nevoie (preparate prea opace) se încălzește ușor lama, evitând fierberea, și se presează lamela pentru o mai bună dispersie a elementelor.

Examenul probelor (sedimentul L. C. R., exsudatul uretral, spută omogenizată) colorate negativ cu tuș de India depistează și identifică rapid *Cryptococcus neoformans*. Într-o mică picătură de exsudat depusă pe lama de microscop se omogenizează o ansă cu tuș de India (tușul se prelevă cu ansa rece, pentru a nu altera stabilitatea suspensiei particulelor de carbon din tuș). Se acoperă cu o lamelă și se examinează cu obiectiv uscat.

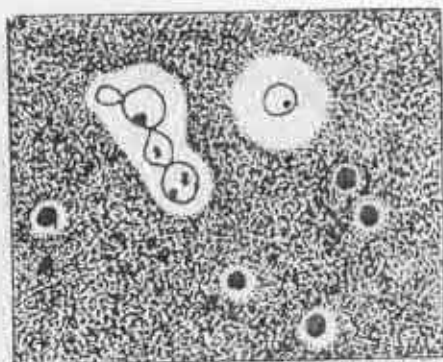


Fig. 40.9. *Cryptococcus neoformans* este o levură cu capsulă polizaharidică enormă. Colorație negativă cu tuș de India

Frotiurile colorate Gram sau Giemsa sunt rar necesare.

Se urmărește:

- Prezența levurilor incapsulate. *C. neoformans* apare ca levuri rotunde, inmugurite, inconjurate cu o capsulă enormă (figura 40.9).
- Prezența sau absența pseudohifelor. *C. albicans* în leziunile de mărgăritărel apare cel mai frecvent sub formă de pseudohife (din cauza creșterii submerse între celulele epiteliale), pe lângă care se observă levuri ovale cu blastospori (figura 40.2).
- Dimensiunea și forma levurilor, a blastosporilor și modul lor de atașare la celula mamă.

40.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează probele necontaminate pe câte o placă cu geloză-sânge și cu geloză Sabouraud glucozată 2—4%. Se utilizează pentru prelevatele contaminate aceleași medii cu adaos selectiv de antibiotice (vezi nota 3 de la tabelul 40.1). Se incubează culturile peste noapte la 37°C. Se însămânțează probele de urină cantitativ: 0,1 ml din diluțiile 10⁻² și 10⁻¹ ale probei epuizate pe câte o placă cu geloză Sabouraud.

Etapa II. Se urmărește apariția coloniilor fine, albe sau bej, cremoase, care degajă o aromă caracteristică de drojdie (aluat dospit). După 3—5 zile ajung până la 2 mm diametru. Coloniile de *Cryptococcus neoformans*, inițial albe, strălucitoare, mucoase, devin progresiv maronii, până la brun.

Se verifică microscopic prezența levurilor în coloniile suspecte și se repică 2—3 colonii pe pantă de geloză Sabouraud, pentru a obține cultura pură stock necesară identificării.

Etapa III. Se identifică levura izolată pe baza următoarelor caractere:

- De cultivare (vezi mai sus).
- Microscopice. *Candida* apare sub formă de levuri ovale cu blastospori în creșterea superficială și sub formă de pseudohife când crește în profunzimea mediului.

Testul de filamentare în ser. *C. albicans* și *C. stellatoidea* sunt singurele specii ale căror blastospori din cultura de 24 ore formează tubi germinativi (filamentează) după incubare de 2—4 ore la 37°C în ser sangvin sau albuș de ou (figura 40.10).

Formarea de chlamidospori. *C. albicans* însămânțată prin zgărietură în profunzimea unei plăci de geloză cu extract de porumb și incubată câteva zile la 25°C crește sub formă

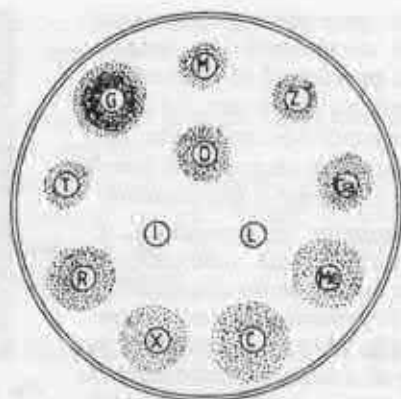
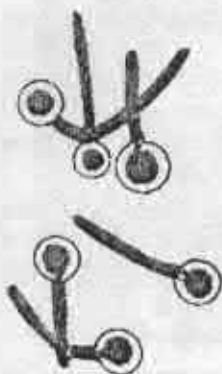


Fig. 40.10. *Candida albicans*: filamentarea (micelizarea) blastosporilor in ser sanguin

Fig. 40.11. Auxanograma pentru *Candida guilliermondii*. Observați: creșterea (asimilarea) in jurul rondelilor cu glucoză (G), maltoză (M), zaharoză (Z), galactoză (Ga), melibioză (Me), celobioză (C), xiloză (X), rafinoză (R), trehaloză (T), dulcitol (D); absența creșterii (lipsa asimilării) in jurul rondelilor cu lactoză (L), inozitol (I)

de pseudohife cu numeroși blastospori la joncțiunea celulelor și cu chlamidospori la extremitatea liberă a celulelor (figura 40.6).

Pe mediile de izolare *Saccharomyces cerevisiae* formează levuri sferice sau ovale, inmagurite. Cultivat pe geloză cu extract de malț generează ascospori, care, pe frotiurile colorate Ziehl-Neelsen, apar acidorezistenți in asce neacidorezistente: 4 ascospori/ască.

■ **Biochimice.** Alte specii decât *Candida albicans* sunt diferențiate pe baza spectrului de asimilare și fermentare a carbohidraților. Auxanograma testează spectrul de asimilare a carbohidraților ca unică sursă de carbon: pe o placă cu mediu minimal sintetic se înșămânțează in pânză tulpina testată, apoi se depun rondelile cu câte un zahăr. Levura crește numai in jurul carbohidraților pe care li asimilează (figura 40.11).

Cryptococcus neoformans este rapid diferențiat de speciile nepatogene ale genului prin capacitatea sa de a produce fenoloxidază.

■ **Structura antigenică.** Prin reacții de aglutinare cu seruri adsorbite, tulpinile de *C. albicans* sunt diferențiate in două serotipuri: A și B, iar cele de *C. neoformans* in patru: A, B, C și D.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză. *C. albicans* și *Saccharomyces cerevisiae* semnifică infecția căilor urinare numai izolate in concentrații de peste 10^4 UFC/ml urină.

40.2.2. Diagnosticul serologic

In candidozele sistemice latex-aglutinarea (LA), imunodifuzia (ID) și contraimmunoelectroforeza (CIE) cu un extract polizaharidic (manan) de *C. albicans* sunt specifice pentru necesitățile clinice. Seroconversia in ID sau CIE și titruri 1:8 in LA confirmă infecția sistemică. RFC este prea puțin specifică (reacții pozitive și la persoane normale sau cu candidoze superficiale).

Infecțiile cu *C. neoformans* pot fi diagnosticate fie identificând antigenul polizaharidic capsular in lichidul cefalorahidian, ser, urină prin LA (particule coafate cu anticorpi), fie depistând anticorpii față de antigenul capsular prin aglutinare in tub, LA ori imunofluorescență indirectă. In LA titruri ale anticorpilor de 1:4 sunt sugestive, iar cele 1:8 confirmă criptococcoza.

40.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și antibiotice sau chimioterapice pentru terapia infecțiilor determinate de levuri

- Antigen polizaharidic de *C.albicans* pentru serodiagnostic prin LA, ID sau CIE.
- Antigen polizaharidic capsular de *C.neoformans* pentru serodiagnostic prin LA; suspensii de *C.neoformans* pentru aglutinare în tub sau imunofluorescență indirectă.
- Suspensie de latex sensibilizată cu anticorpi anti-*C.neoformans* pentru depistarea antigenului polizaharidic în umori.
- Nistatină, miconazol, chetoconazol, clotrimazol pentru terapia candidozelor cutancomucoase.
- Amfotericină B pentru terapia candidozelor sistemice și a infecțiilor cu *C.neoformans*.

40.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A DERMATOFITILOR

40.3.1. Diagnosticul microbiologic

40.3.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă: scuamele raclate de pe suprafața leziunilor; firele de păr afectate (vezi mai jos), raclatul unghiilor atacate.

Firele de păr invadate de fungii dermatofiti sunt friabile, au aspect prăfos și examinate în camera obscură sub radiație ultravioletă au fluorescență verde strălucitoare în infecția cu *Microsporum* sau *Trichophyton schoenleinii*. Fluorescența este gri-albă sau lipsește în infecția cu alte specii de *Trichophyton*. Rezultatele pozitive sunt concludente, cele negative trebuie confirmate microscopic, pentru că numai perii complet invadați devin fluorescenți. Se smulg cu o pensă firele suspecte.

40.3.1.2. Microscopia directă

Se montează probele între lamă și lamelă în soluție 10–20% KOH (revedi 40.2.1.2.) și se examinează, după clarificare, cu obiectivul uscat 10X și 40X.

În scuame și fragmentele de unghii prezența hifelor ramificate și lanțurilor de artrospori indică diagnosticul de dermatofitie, fără a preciza specia fungului infectant (figura 40.12). Examenul firelor de păr aduce informații mai precise. *Microsporum* formează pe suprafața externă a părului mănșoane de spori mici (2–3 μm diametru) cu aspect mozaicat, infecție exotrix (figura 40.13). *T.schoenleinii* și *T.tonsurans* formează hife și lanțuri de spori mari (4–6 μm diametru) în interiorul părului, infecție endotrix. Caracteristic, în infecțiile cu *T.schoenleinii* endotrix apar bule de gaz și arii tubulare goale, care marchează locul hifelor degenerate (figura 40.14). Alte specii de *Trichophyton* formează ectotrix șiruri paralele de spori.

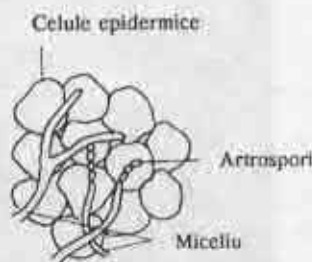


Fig. 40.12. Celule epidermice invadate de un fung dermatofit

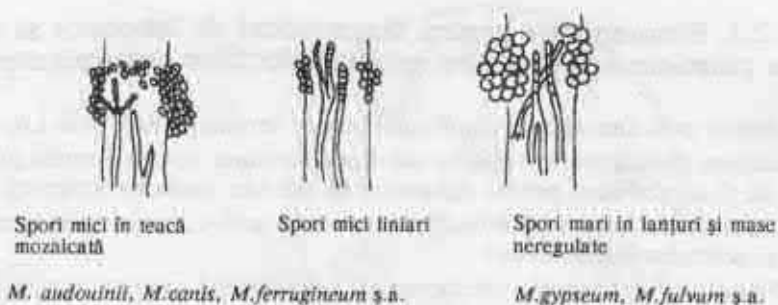


Fig. 40.13. Fire de păr atacate de *Microsporium*: teci de sporii ectotrix

40.3.1.3. Izolarea și identificarea

Se însămânțează probele prin depunere sau înțepare în pantă de geloză Sabouraud cu antibiotice (vezi nota 3, tabelul 40.1) și se incubează culturile 1—3 săptămâni la 25°C.

Se identifică izolatele pe baza caracterelor de cultură și microscopice:

Microsporium audouinii, specie antropofilă, cultivă mai lent decât alte specii ale genului. După 12—21 zile, pe mediul Sabouraud apar colonii, care, la maturitate, sunt rotunde, fin pufoase, cu buton central, pigmentat în roz, de la care pleacă spre periferie proeminențe radiale (figura 40.15, a). Macroconidii, subțiri și distorsionate, apar rar. În culturi bătrâne se observă chlamidospori. Specia zoofilă *M. canis* cultivă după 5—7 zile, iar coloniile sunt

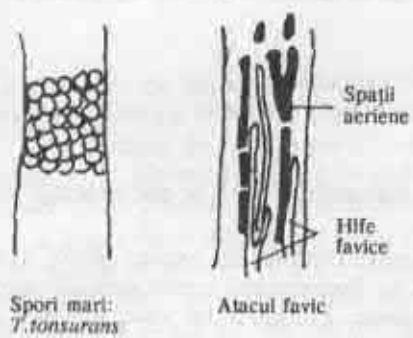


Fig. 40.14. Fire de păr atacate de *Trichophyton*

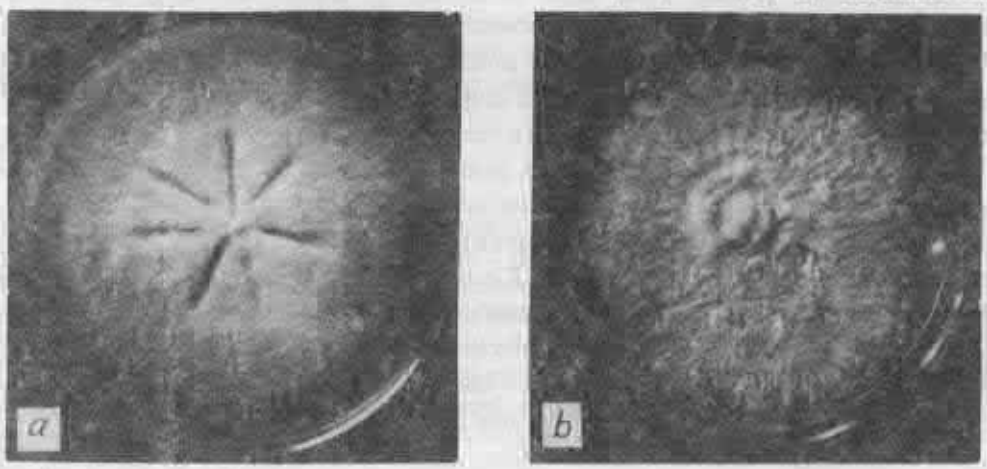


Fig. 40.15. Colonii de *Microsporium*: a — *M. audouinii*; b — *M. gypsum*

pufoase cu reversul pigmentat în galben-portocaliu. Macroconidiile sunt numeroase cu pereții groși și cu vârful frecvent incurbat (figura 40.16,a), iar specia geofilă, *M.gypseum*, cultivă și mai repede, în 3—6 zile, și formează colonii plate cu aspect prăfuit (figura 40.15,b); macroconidiile numeroase au perete mai fin, dar rugos (figura 40.16,b).

Trichophyton schoenleinii cultivă relativ lent (10—14 zile) și formează pe

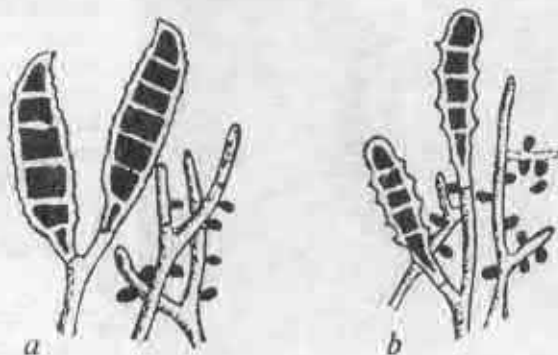


Fig. 40.16. *Microsporium*, micro- și macroconidii: a — *M. canis*; b — *M. gypseum*



Fig. 40.17. Colonii de *Trichophyton schoenleinii*

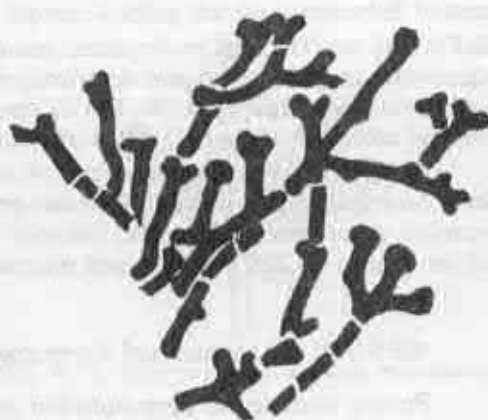


Fig. 40.18. *Trichophyton schoenleinii*, tarse favice

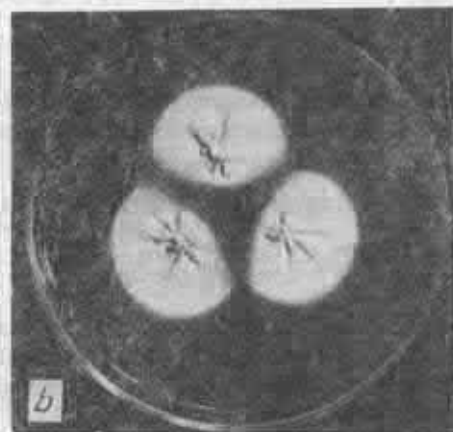
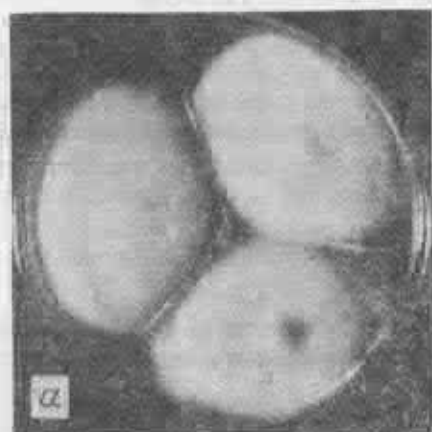


Fig. 40.19. Colonii de *Trichophyton*: a — *T. mentagrophytes*; b — *T. tonsurans*

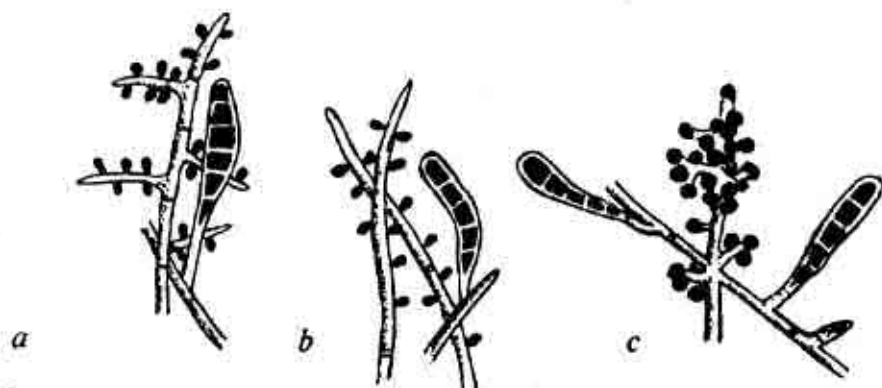


Fig. 40.20. *Trichophyton*, aspecte de hife și conidii: a — *T. tonsurans*; b — *T. rubrum*; c — *T. mentagrophytes*

mediul Sabouraud colonii galben-cenușii, ca ceara, cu suprafața uneori zbârcită (figura 40.17). Cel mai frecvent nu formează conidii. În schimb, în hifele ramificate dihotomic și segmentate inegal apar grupuri de artrospori cu formă neregulată, așezați ca oasele tarsului («tarse favice») (figura 40.18). Restul speciilor de *Trichophyton* pot fi diferențiate după aspectul coloniilor (figura 40.19) și al conidiilor (figura 40.20).

Epidermophyton floccosum cultivă în cca 7 zile. Coloniile, inițial albe și granulare devin progresiv galben-cenușii, catifelat-prăfoase, cu șanțuri radiale (figura 40.21). Macroconidii numeroase, măciucate, frecvent neseptate, cu perete fin, apar la extremitatea hifelor (figura 40.22). Nu formează microconidii.

40.3.1.4. Tratamentul dermatofitiilor

Pentru tratamentul dermatofitiilor sunt utile antibiotice : griscofulvină.

40.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU FUNGI DIMORFI

Fungii dimorfi, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Sporothrix schenckii* determină infecții sistemice.

40.4.1. Diagnosticul microbiologic

40.4.1.1. Prelevate patologice

În raport cu localizarea infecției se examinează: spută, puroi și exsudate, lichid cefalorahidian, probe bioptice tisulare, hemoculturi. Măduva osoasă este foarte utilă pentru depistarea microscopică și izolarea *H. capsulatum*.

40.4.1.2. Microscopia directă

Se examinează:

■ Preparatul între lamă și lamelă montat în soluție 10—20% KOH pentru clarificare. Adăugarea extemporaneu în soluția de KOH a unei picături de tuș de India facilitează, prin colorație negativă, observarea și identificarea *B. dermatitidis*, *C. immitis* sau *Cryptococcus neoformans*.

■ Frotiuri colorate Giemsa.

■ Secțiuni histologice ale probelor biopice colorate cu hematoxilinozină.

Colorații speciale pentru fungi, care impun impregnare argentică, sunt mai puțin accesibile.

Blastomyces dermatitidis: levuri mari sferice de 8—20 μm , cu perete gros, refringent, care dă impresia de dublu contur. Obişnuit, un singur blastospor este ataşat de celula mamă printr-un sept larg de 4—5 μm (figura 40.23, a).

Coccidioides immitis: sferule (sporangii) cu diametrul între 20 și 200 μm . Sferulele mature au perete fin și conțin numeroși spori sferici de 2—5 μm . Uneori apar fantome de sferule colabate după ruperea peretelui și eliberarea sporilor. Sferulele imature au 10—20 μm diametru, conțin material granular, au perete gros și pot fi confundate cu levuri neînmugurite de *B. dermatitidis* sau *C. neoformans* (figura 40.24, a).

Histoplasma capsulatum se observă mai bine pe preparatele colorate Giemsa, cu hematoxilinozină sau prin impregnație argentică. Apare mai frecvent intracelular în macrofage, celule gigante sau polimorfonucleare, rar liberă, ca levuri unice sau multiple, rotunde sau piriforme de 1—3/3—4 μm . Frecvent o vacuolă mare dă citoplasmei, colorată în roșu, aspectul de semilună deplasată spre extremitatea largă a celulei (figura 40.25, a).

Sporothrix schenckii apar rar ca levuri rotunde până la fusiforme, înmugurite (figura 40.26, a).

40.4.1.3. Izolarea și identificarea

Etape I. Se însămânțează probele prin epuizare pe:

■ Geloză-sânge cu incubare la 37°C pentru izolarea formei levurice.

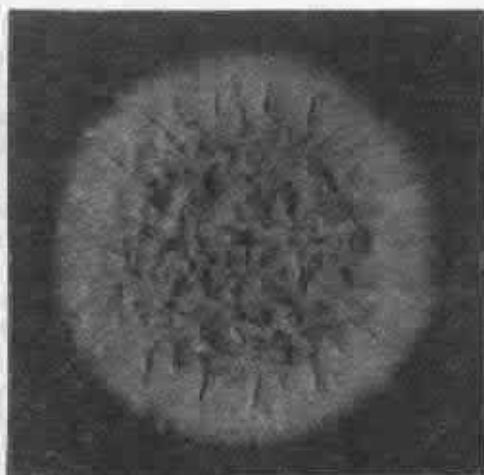


Fig. 40.21. Colonie de *Epidermophyton floccosum*

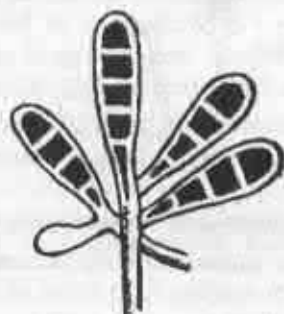


Fig. 40.22. *Epidermophyton floccosum*, macroconidii

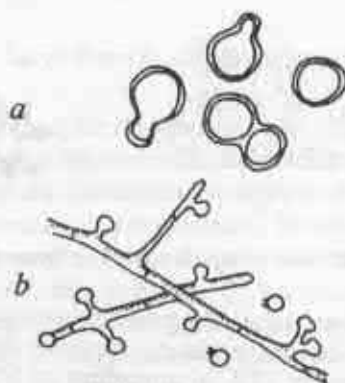


Fig. 40.23. *Blastomyces dermatitidis*: a — forma tisulară (levurică); b — forma filamentoasă



Fig. 40.24. *Coccidioides immitis*: a — forma tisulară (sferule, matură și imatură), b — forma filamentoasă.

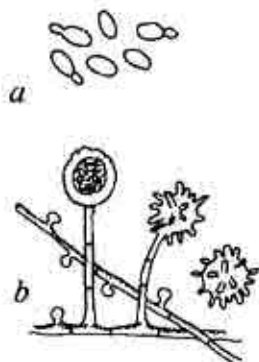


Fig. 40.25. *Histoplasma capsulatum*: a — forma tisulară (levuri intracelulare); b — forma filamentoasă cu microconidii și macroconidii echinulate.

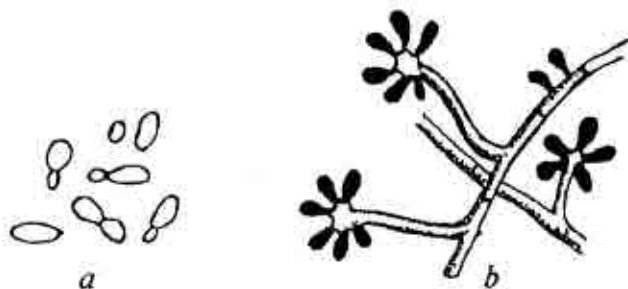


Fig. 40.26. *Sporothrix schenckii*: a — forma tisulară (levurică); b — forma filamentoasă.

forma levurică se face prin cultivare și subcultivare, repetată la nevoie, pe panta unui mediu special de conversie cu incubare la 37°C. Conversia la sferule a *C. immitis* impune incubarea la 37°C și atmosferă cu 5% CO₂ în mediu lichid special.

Inocularea intraperitoneală la șoarece sau cobai reprezintă testul de conversie a formei miceliene la forma tisulară; poate fi utilizată însă și ca metodă de izolare și test de patogenitate. Se inoculează intraperitoneal suspensia culturii în faza micelială la mai multe animale. După două săptămâni se sacrifică și se necropsiază, săptămânal, câte un animal și se urmărește prezența leziunilor nodulare în peritoneu, splină, ficat. Se examinează frotiuri din leziuni, colorate Gram, Giemsa sau cu hematoxilineozină, pentru prezența

■ Geloză Sabouraud glucozată 2% cu incubare la 25°C pentru izolarea formei miceliene.

Se utilizează pentru prelevatele contaminate medii cu amestec selectiv de antibiotice (vezi nota 3, tabelul 40.1).

Se efectuează hemoculturile în mediul difazic, pentru a le putea urmări până la 6 săptămâni fără riscul contaminării.

Etapa II. Se urmăresc culturile zilnic în prima săptămână, apoi săptămânal până la 6 săptămâni. Se iau toate măsurile pentru a preveni infecția de laborator prin sporii fungilor dimorfi: epuizarea probelor pe pante de geloză Sabouraud; închiderea plăcilor cu bandă adezivă, aplicarea măștii de protecție, manipulare în incintă de protecție microbiologică (revedi 1.5.3.).

Etapa III. Identificarea preliminară a fungilor dimorfi se face prin recunoașterea formei levurice din culturile incubate la 37°C și a formei miceliale din culturile incubate la 25°C.

Identificarea definitivă impune confirmarea dimorfismului prin conversia de la o fază la alta *in vitro* sau *in vivo*.

Laboratoarele care au seruri imune de referință pot identifica mai simplu și mai sigur acești fungi.

Conversia *in vitro* a formei miceliene la

formelor tisulare ale fungului: levuri libere (*Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*), levuri intracelulare (*Histoplasma capsulatum*) sau sferule (*Coccidioides immitis*).

Blastomyces dermatitidis. Pe geloză-sânge la 37°C, după 2—5 zile, formează colonii zbârcite, ceroase, moi, în care fungul poate fi observat în faza levurică amestecat cu scurte fragmente miceliene subdezvoltate. Pe geloză Sabouraud la temperatura camerei formează, între 4 și 30 zile, colonii albe sau castanii în care creșterea, inițial levurică, devine progresiv micelială cu hife ramificate purtătoare de conidii sferice sau ovale, cu diametrul de 2—10 μm, pe conidiofori subțiri laterali sau terminali (figura 40.23,b).

Coccidioides immitis. În culturi pe geloză Sabouraud sau geloză-sânge creșterea este micelială, în interval de 2—21 zile, cu formare de colonii albe, pufoase. Hifele aeriene formează artrospori în formă de butoi, care alternează cu celule goale (figura 40.24,b). Sferule nu apar la cultivarea *in vitro*.

Histoplasma capsulatum. Pe geloză-sânge la 37°C, după 7—14 zile, apar colonii rugoase sau mucoide colorate în crem formate din levuri ovale de 2—3/4—5 μm. Între unicul blastospor de la extremitatea ascuțită și celula mamă persistă un mic por.

Pe geloză Sabouraud la 25°C coloniile apar între 5 și 45 zile; inițial sunt albe, pufoase, uneori glabre, dar pe măsură ce apare miceliul aerian devin maronii-brune. Microscopic se depistează hife septate, ramificate, subțiri cu diametrul de 1—2,5 μm. Microconidii sesile, rotunde sau piriforme, se aliniază în lungul hifelor. Macroconidiile, sferice sau piriforme, sunt caracteristic tuberculate sau echinulate (figura 40.25,b).

Sporothrix schenckii. Pe geloză-sânge la 37°C, după cca 5 zile, apar colonii asemănătoare celor bacteriene (alb-crem, cu suprafața neregulată, moi) formate din levuri în formă de trabuc.

Pe geloză Sabouraud la 25°C, după 3—5 zile, coloniile sunt punctiforme, cresc progresiv și devin pielose, zbârcite, pigmentate de la crem la negru. Microscopic, în colonii observăm un miceliu cu hife subțiri ramificate. Microconidii ovale sunt grupate în buchete la extremitatea unor conidiofori subțiri și alineate în lungul hifelor (figura 40.26,b).

40.4.2. Diagnosticul serologic

Pentru confirmarea suspiciunii de infecție cu fungi dimorfi, simpla prezență a anticorpilor respectivi este suficientă.

■ În suspiciunea de *blastomicoză* se utilizează reacțiile de imunodifuzie (ID) și de fixare a complementului (RFC) cu un antigen extras din filtratul culturii de o săptămână, în bulion, a formei miceliale de *Blastomyces dermatitidis*. Imunodifuzia trebuie practică cu un ser martor de la pacient sau animal cu *blastomicoză* demonstrată. Numai aceste seruri relevă în antigenul blastomicozic «linia de precipitare A», singura caracteristică. Până la 20% din rezultatele ID cu serul precoce pot fi fals negative. De aceea, în cazul reacțiilor negative, testele se vor repeta după 3 săptămâni pe o nouă probă de ser, adăugând la testare și antigeni de *C.immitis* și *H.capsulatum*, iar investigația micologică va continua.

■ În suspiciunea de *coccidioidomicoză* sunt utile reacțiile de precipitare în tub (PT), ID, LA și RFC folosind ca antigen *coccidioidina*, care este filtratul culturii de *C.immitis* în bulion incubate 8 săptămâni la temperatura camerei. Mai sunt utile intradermoreacții cu *sferulină*, extractul din sferule de *C.immitis*. Precipitarea în tub se pozitivează la cca 2 săptămâni de la debutul infecției; LA este mai sensibilă și se pozitivează mai precoce, dar este mai puțin specifică (6—10% rezultate fals pozitive) și trebuie confirmată prin PT, ID sau RFC.

■ Suspiciunea de *histoplasmoză* poate fi confirmată prin RFC, ID, CIE sau LA cu suspensie inactivată a formei levurice sau cu *histoplasmină*, care este filtratul culturii de 6 luni în mediu lichid a formei miceliale a fungului. Anticorpii față de forma levurică apar după 4 săptămâni de la debutul infecției, cei față de histoplasmină mai tardiv. Intradermoreacții cu histoplasmină se pot face pentru depistarea infecțiilor latente, dar se vor practica numai după efectuarea reacțiilor serologice, pentru că histoplasmina este imunogenă și poate determina reacții serologice fals pozitive.

■ La bolnavii cu *sporotricoză* se pot practica: aglutinarea în tub (AT) cu suspensie levurică sau LA. Latex-aglutinarea este mai sensibilă și mai specifică decât AT, care, la diluții de 1:8—1:16 ale serurilor, poate da reacții încrucișate la pacienți cu leishmanioză.

40.4.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și chimioterapice utile contra infecțiilor cu fungi dimorfi

■ Seruri imune adsorbite și antigeni martor pentru identificarea antigenică a izolatelor.

■ Antigen pentru serodiagnosticul blastomicozei.

■ Coccidioidină pentru serodiagnostic și sferulină pentru i.d.r. în coccidioidomicoză.

■ Histoplasmină pentru serodiagnostic sau i.d.r. în histoplasmoză.

■ Suspensie levurică și particule de latex sensibilizate cu extract antigenic de *Sporothrix schenckii* pentru serodiagnosticul sporotricozei.

■ Amfotericina B este antibioticul de elecție pentru tratamentul infecțiilor cu fungi dimorfi. În cazuri mai puțin severe poate fi utilizat chetoconazolul. Indicațiile miconazolului, imidazolului etc. variază cu etiologia bolii. Sporotricoză cutanată răspunde favorabil la tratamentul cu soluție saturată de iodură de potasiu.

40.5. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR DETERMİNATE DE FUNGI FILAMENTOSI OPORTUNIȘTI

Numărul mare al acestor fungi depășește posibilitatea descrierii lor amănunțite în acest manual. Identificarea lor și diagnosticul corect al infecțiilor determinate este de competența unor laboratoare specializate. Date rezumative asupra speciilor, infecțiilor, prelevatelor patologice indicate pentru diagnostic și metodelor de diagnostic sunt rezumate în tabelul 40.1.

Vom insista numai asupra unor principii generale privind prelevarea, prelucrarea probelor și interpretarea rezultatelor.

În prelevatele superficiale din zone contaminate (exsudate din plăgi) sau contaminate pe traiectele de eliminare (spută) prezența hifelor acestor fungi trebuie interpretată prudent; pot fi contaminanți. În probele bioptice hifele pot rămâne mascate în cazuum sau țesut fibros. Digestia peptică eliberează hifele și scade proporția rezultatelor fals negative. Șansa de a observa hife viabile este mai mare la periferia leziunilor în zona de invazie tisulară. Microdisecția pieselor bioptice la stereomicroscop facilitează reperarea realului produs patologic de examinat. Este contraindicată majorarea pieselor care dezorganizează și distruge hifele fungice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE ACTINOMICETE

41.1. DATE GENERALE

41.1.1. O minidefiniție

Actinomicetele sunt bacterii gramvariabile până la grampozitive, în general imobile, pleomorfe, care cresc sub formă de filamente cu diametrul sub $1 \mu\text{m}$, mai lungi sau mai scurte, ramificate. În cultură pot lua aspect micelian, dar hifele se fragmentează ușor în forme bacilare ramificate sau cocoide. Unele genuri produc conidii sau spori.

41.1.2. Repere taxonomice

Conform definiției morfologice propuse mai sus, actinomicetele reunesc mai multe genuri. Cu importanță pentru patologia umană sunt:

- *Actinomyces* — specii neacidorezistente, nu produc spori sau conidii. Facultativ anaerobe, majoritatea preferențial anaerobe, unele cresc bine aerob. Creșterea le este stimulată prin CO_2 . Catalazonegative, atacă zaharurile fermentativ.

- *Nocardia* — specii slab acidorezistente, produc lanțuri de conidii, mai frecvent pe hifele aeriene decât pe cele vegetative. Aerobe, catalazopozitive, atacă zaharurile oxidativ.

- Alte genuri: *Arachnia*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Oerskovia*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Streptomyces*, *Dermatophilus*, *Micropolyspora*, *Saccharamonospora* etc.

41.1.3. Habitat

Actinomyces și *Arachnia* sunt găzduite în cavitatea bucală și pe amigdalele omului sau animalelor. În gură fac parte din biocenoza plăcii dentare. Ocazional și tranzitoriu, pot ajunge în alte cavități ale organismului (intestin, vagin, conjunctivă).

Restul actinomicetelor sunt organisme saprofite prezente în materiale biodegradabile și sol, unde joacă un rol important în descompunerea materiilor organice și fixarea azotului.

41.1.4. Factori de patogenitate

Factorii de patogenitate ai acestor microorganisme condiționat sau accidental patogene sunt prea puțin cunoscuți. Au capacități sensibilizante. Frecvent infecțiile determinate sunt mixte.

41.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu actinomicete

Deficiențe ale apărării antiinfecțioase locale sau sistemice deschid calea infecției cu actinomicete.

41.1.6. Infecții cu actinomicete

Actinomicoza umană este mai frecvent cauzată de *Actinomyces israelii*, dar pot fi implicate și alte specii găzduite în gură ca *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes*, *Arachnia propionica*¹. Boala este o infecție cronică granulomatoasă, care produce abcese. Clinic pacienții prezintă tumefiere locală cu consistență lemnoasă, relativ nedureroasă și fără adenită. Ulterior apar puncte fluctuante drenate de multiple fistule, prin care se scurge un puroi fluid, uneori cu grunji galbeni de 0,2—1 mm diametru, numiți «granule de sulf», de fapt colonii tisulare ale actinomicetului infectant (mai frecvent observate în infecția cu *A. israelii*).

Cel mai frecvent actinomicoza apare în regiunea cervicofacială (cca 60% din localizări), urmată de cea abdominală (cca 30%) și toracică. Localizări genitale sunt posibile după utilizarea dispozitivelor contraceptive intrauterine. Din focarul primar infecția se poate disemina din aproape în aproape, prin inhalare sau hematogen. Diseminarea hematogenă explică leziunile actinomicotice închise din organe ca ficatul, rinichii, valvele cardiace.

Infecții cutanate, rare, complică plăgile mușcate de om.

Speciile de *Actinomyces* constituie cca 70% din microorganismele plăcii dentare supra- și subgingivale, fiind implicate în patogenia cariei dentare și a bolii parodontale.

Actinomyces israelii, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus* pot cauza conjunctivite, dacriocistite, canaliculite lacrimale, cheratite sau infecții intraoculare.

Nocardiiile determină supurații ale plăgilor, supurații pulmonare sau infecții sistemice fără caractere clinice distincte de alte etiologii. Speciile mai frecvent implicate în nocardiozele din regiunile temperate sunt: *N. asteroides* și *N. farcinica*. Alte specii mai rar izolate din infecții umane sunt *N. brasiliensis* și *N. otitidiscaviarum*.

Actinomicetoame pot determina specii de *Actinomadura* și *Streptomyces somaliensis*.

Infecții sistemice cu *Rhodococcus* au fost semnalate la pacienții imunodeficienți.

Sporii unor actinomicete ca *Micropolyspora faeni* și *Saccharomonospora viridis* sensibilizează prin inhalare bronhiile și pulmonii, determinând pneumonite alergice (pulmonul fermierilor).

41.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR DETERMİNATE DE ACTINOMICETE

În zonele temperate suntem mai frecvent confrunțați cu diagnosticul actinomicozei și nocardiozei. Diferențierea corectă a actinomicetoamelor de eumicetoame este esențială pentru tratamentul antimicrobian corect.

1

Sinonim *Propionibacterium propionicum*.

41.2.1. Diagnosticul microbiologic

41.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de forma clinică a infecției se examinează:

- puroiul scurs sau aspirat din fistule sau prin puncție;
- probe biotice;
- spută;
- spălătură bronșică;
- sedimentul lichidului cefalorahidian sau urinei.

41.2.1.2. Microscopia directă

Se dispersează o parte din proba de puroi într-o cutie Petri cu soluție salină izotonă, pe fond negru, pentru a depista cu ochiul liber sau cu lupa granulele caracteristice: «granule de sulf» în actinomicoză și nocardioză, granule albe-gălbui sau roșietice, neregulat ovale sau lobulate, cu diametrul de 1—5 mm în infecțiile cu *Actinomadura madurae*; roșii, sferice, ovoide, cu diametrul de 0,3—0,5 mm în cele determinate de *Actinomadura pelletieri*; galbene-dens până la brune, rotunde sau ovale, cu diametrul de 1—2 mm în infecțiile cu *Streptomyces somaliensis*. «Granule de sulf» poate forma în puroi și *Staphylococcus aureus*. E de reținut că granulele nu sunt prezente întotdeauna în puroiul actinomicotic.

Examenul preparatului umed între lamă și lamelă. Se depune un granul prelevat din probă într-o picătură de apă pe o lamă de microscop. Se acoperă cu o lamelă și se presează ușor pentru ca, prin zdrobire, să se expună structura granului.

Se scrutează preparatul cu mărire de 100X, iar detaliile se examinează cu mărire de cca 600X. În fiecare granul se pot depista 5—6 mase cu diametrul de cca 100 μ m, înconjurată cu filamente radiare, ramificate, groase de cca 1 μ m sau mai subțiri, refringente, măciucate și dispuse în planuri diferite. Aspectul măciucat poate lipsi.

În absența granulelor, preparatul umed poate depista numai hife subțiri, ramificate.

În continuare, se zdrobește, ca mai sus, un granul între două lame de microscop. Separând lamele, se obțin două frotiuri pentru colorațiile uzuale: Gram și Ziehl-Neelsen modificată.

Examenul frotiului colorat Gram. Pe frotiul din «granulele de sulf», examinate cu obiectiv uscat, *Actinomyces* apare ca o masă centrală de filamente încalcite grampozitive, înconjurată de filamente măciucate gramnegative. Aspectul măciucat nu se observă întotdeauna.

Când lipsesc «granulele de sulf» din probă, frotiul obișnuit depistează fie filamente ramificate grampozitive, care formează un miceliu lax, fie bacili corineformi ori forme cocoide rezultate din fragmentarea filamentelor. *Nocardia* tinde a se colora neregulat, filamentele având aspect moniliform cu porțiuni grampozitive pe fond gramnegativ. Oricum, formele filamentoase nu diferențiază speciile de actinomicete, iar formele bacilare pot fi confundate cu corinebacteriile.

Examenul frotiului colorat Ziehl-Neelsen. Depistarea acidorezistenței, după colorație Ziehl-Neelsen modificată, diferențiază speciile de *Nocardia*, slab acidorezistente, de alte actinomicete, neacidorezistente.

41.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se preferă însămânțarea granulelor de puroi spălate și zdrobite. Se însămânțează în triplicat pante cu geloză Sabouraud glucozată și se epuizează proba pe o placă cu geloză-sânge¹ pentru incubare aerobă și pe două plăci cu geloză-sânge pentru incubare anaerobă.

Se incubează, aerob și anaerob (cu 10% CO₂) la 37°C, mediile însămânțate. Se urmărește, comparativ, creșterea aerobă și anaerobă la fiecare 2 zile timp de 2 săptămâni.

În suspiciunea nocardiozei, incubarea culturilor aerobe și la 45°C favorizează cultivarea *N.asteroides* în detrimentul bacteriilor de contaminare.

Temperatura optimă de incubare pentru *Actinomadura* este de 27–30°C, iar coloniile apar după cca 4 săptămâni.

Etapa II. Microcoloniile de *Actinomyces* sau *Arachnia*, filamentoză cu aspect de păianjen, se pot observa la stereomicroscop (100X) după 2–4 zile de incubare. La maturitate (7–14 zile) coloniile, cu diametrul de 0,5–2 mm, fără filamente aeriene, diferă cu specia: alb-cenușiu cu aspect de molar (*Actinomyces israelii*, *Arachnia propionica*) sau rotunde, netede, fin granulare (*Actinomyces naeslundii*, *A.pyogenes* ș.a.).

Coloniile mature de *Nocardia* (3–7 zile) au 3–4 mm diametru, sunt bombate și zbârcite, cretoase, pigmentate în portocaliu, roșu sau roz. La stereomicroscop apar acoperite cu filamente aeriene. Cele de *Actinomadura* (cca 4 săptămâni) sunt bombate, zbârcite, ceroase, albe sau pigmentate de la portocaliu la roșu; au filamente aeriene. *Streptomyces* formează colonii bombate, zbârcite, cretoase, pigmentate de la crem la brum și negru, acoperite cu filamente aeriene alburii.

Se verifică microscopic câteva colonii suspecte pentru prezența de filamente ramificate grampozitive cu tendință de fragmentare în bacili corineiformi și care sunt repicate pentru controlul purității și acumulare de cultură stock necesară identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

a) *Microscopice:* În subculturi *Actinomyces* apare ca bacili grampozitivi, ușor incurbați, pleomorfi și filamente ramificate subțiri cu grosimea de maximum 1 μm și lungimea de 10–50 μm sau mai mult.

Nocardiiile sunt mai puțin acidorezistente decât în prelevatele patologice și formează ocazional conidii rudimentare pe hifele aeriene, mai rar pe cele vegetative.

Actinomadura și *Streptomyces* formează hife care nu se fragmentează și poartă lanțuri lungi de conidii.

Actinomicetele sunt imobile; ca o excepție apare *Oerskovia* ale cărei hife se fragmentează ușor în forme bacilare mobile, inițial monotriche, ulterior peritriche.

b) *De cultivare:* izolate aerobe (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Streptomyces*), facultativ anaerobe (*Arachnia*, *Oerskovia*), anaerobe carboxifile (*Actinomyces israelii*), facultativ anaerobe și carboxifile (alte specii de *Actinomyces*); coloniile sunt nehemolitice cu excepția *Actinomyces pyogenes*, care formează colonii β-hemolitice.

c) *Biochimice:*

■ Diferențierea actinomicetelor aerobe o facem prin testele menționate în tabelul 41.1. Se însămânțează și se incubează mediile test la 27–30°C timp de 2 săptămâni cu citirea reacțiilor la fiecare 2 zile.

1

Pe bază de infuzie din cord și creier.

Tabelul 41.1. Identificarea actinomicetelor aerobe (bacteriile nocardiforme) cu interes medical

Specia	Hidroliza ¹				Acid din		Lizozim
	cazeină	tirozină	xantină	uree	lactoză	xiloză	
<i>Nocardia asteroides</i>	—	—	—	+	—	—	R
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	—	+	—	—	R
<i>N. otitiscaviarum</i>	—	—	+	+	—	—	R
<i>Actinomadura madurae</i>	+	+	—	—	d	+	S
<i>A. pelletieri</i>	+	+	—	—	—	—	S
<i>Streptomyces somaliensis</i>	+	+	—	—	—	—	S
<i>S. paraguayensis</i>	+	+	+	+	—	—	S
<i>Streptomyces</i> sp. (nepatogene)	V	V	V	V	+	+	S

Simboluri: ↔ — ≥ 90% din tulpini pozitive; ← — ≥ 90% din tulpini negative; d — 11—89% din tulpini pozitive; V — variabil, în raport cu specia; R — rezistent; S — sensibil.
¹Incubare 2 săptămâni la 27—30°C.

■ Actinomicetele anaerobe și facultativ (preferențial) anaerobe trebuie diferențiate de bacilii grampozitivi anaerobi nesporulați. Testările sunt dificile; în laboratoarele obișnuite rezultatele sunt numai prezumtive (tabelul 41.2) și trebuie confirmate în laboratorul de referință prin identificarea gaz-cromatografică a produșilor finali din metabolismul carbohidraților (acizii formic, acetic, propionic, lactic, succinic).

d) *Structura antigenică.* Față de identificarea biochimică a actinomicetelor, identificarea antigenică este mai simplă, dar rămâne tot de competența laboratorului de referință.

Speciile de *Actinomyces* și *Arachnia* pot fi diferențiate, iar în cadrul speciilor pot fi identificate serovaruri, folosind seruri imune adsorbite în colorații imunofluorescente. Mai accesibilă este însă imuno-dubla-difuzie, care folosește un extract autoclavat al culturii suspensionate în soluție salină izotonă.

În ciuda reacțiilor încrucișate, genurile de actinomicete aerobe au fost diferențiate între ele și de *Actinomyces* prin reacții de imunofluorescență și imunodifuzie. *Nocardia* poate fi identificată la nivel de specie și serovar prin imunodifuzie, folosind ca antigen dezintegratul celular sau filtrate ale culturilor în bulion.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză. Când, pentru identificarea speciei, suntem obligați să apelăm la laboratorul de referință, ne rezumăm la identificarea prezumtivă pe baza caracterelor microscopice, de cultură și testului catalazei formulând rezultatul în termeni descriptivi: «Bacili (filamente) grampozitivi nesporulați anaerobi/facultativ (preferențial) anaerobi/aerobi, probabil ... (genul, specia), ceea ce satisface necesitățile terapeutice».

Tabelul 41.2. Diferențierea actinomicetelor anaerobe și preferențial anaerobe de bacili gram-pozitivi anaerobi nesporulați

Caractere	<i>Actinomyces</i>	<i>Arachnia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Propionibacterium</i>
Creștere aerobă	D	d	—	—	D	D
Microcolonii filamentoase	D	+	—	—	—	—
Catalază	D ¹	—	—	—	—	D
Nitratreductază	D	+	—	D	—	D
Acizi-produși finali ai fermentării glucozei:						
■ formic	+	—	—	D	...	—
■ acetic	+	+	+	+	d	+
■ propionic	—	+	—	D	—	+
■ lactic	+	+	+	+	+	+
■ succinic	+	+	D	d	d	d

Simboluri: ↔ — ≥ 90% din tulpini pozitive; ←→ ≥ 90% din tulpini negative; d — 11—89% din tulpini pozitive; D — reacții diferite în raport cu specia; ... — lipsa informațiilor.
Catalazopozitive sunt: *Actinomyces viscosus*, *A. howellii* și *A. hordeovulneris*.

41.2.2. Diagnosticul imunologic

Diferențierea actinomicetoamelor de eumicetoame este foarte importantă sub aspect terapeutic. Au fost utilizate reacțiile de imunodifuzie, contraimmunoelectroforeză și de fixare a complementului. Pentru diagnosticul indirect al nocardiozelor rezultate bune au dat testul intradermic de sensibilizare și, mai ales, ELISA.

41.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul actinomicozelor

- Seruri imune adsorbite pentru identificarea antigenică a actinomicetelor aerobe sau anaerobe prin colorație imunofluorescentă sau imunodifuzie.
- Extracte antigenice pentru serodiagnostic prin teste de imunodifuzie și RFC.
- Extract de *Nocardia* pentru testare intradermică și pentru ELISA.
- Antibiotice. Tratamentul antimicrobian al actinomicetoamelor este total diferit de cel al eumicetoamelor. În infecțiile cu *Actinomyces* sunt active: penicilina, tetraciclina, sulfamide; au fost obținute rezultate și cu eritromicina, cloramfenicol și cu asociația trimetoprim + streptomycină. Nocardiiile sunt sensibile în special la sulfamide, aminoglicozide și tetraciclina; cefalosporinele și penicilinele sunt mai puțin active.

Partea a treia

VIROLOGIE

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR

În diagnosticul de laborator al infecțiilor virale trebuie de avut în vedere o serie de aspecte clinico-epidemiologice, metodologice și tehnice, care ar putea influența exactitatea rezultatelor analizei. Unele din aceste aspecte sunt:

a) o mare varietate de virusuri, bacterii, rickettsii și alte microorganisme produc aproximativ același sindrom clinic (infecții respiratorii acute, gastroenterite ș. a.);

b) agentul cauzal al unei infecții concrete nu poate fi identificat numai pe baza simptoamelor clinice;

c) depistarea virusului sau a antigenilor virali specifici în produsul patologic recoltat de la bolnav este posibilă cu o mai mare precizie, dacă se efectuează în primele zile de boală, dacă acest produs se recoltează corect și dacă se asigură condițiile pentru menținerea viabilității agentului patogen;

d) punerea în evidență a creșterii titrului de anticorpi specifici de cel puțin 4 ori în serul bolnavului, ceea ce demonstrează cu certitudine un răspuns imun activ;

e) un rol deosebit revine metodelor și tehnicilor de laborator utilizate, ca și dotării laboratorului cu utilaj și reactivi.

Diagnosticul de laborator al virozelor se face prin trei metode:

- Depistarea agentului patogen sau a componentelor lui direct în prelevatul patologic de la bolnav (diagnosticul rapid și precoce).

- Izolarea virusului din prelevatul patologic și identificarea lui.

- Determinarea dinamicii anticorpilor specifici antivirali prin analiza serurilor perechi.

42. 1. DIAGNOSTICUL RAPID AL VIROZELOR

Diagnosticul rapid permite a depista virusul sau componentele lui direct în prelevat de la bolnav și a formula răspunsul peste câteva ore. În acest scop se utilizează cu rezultate foarte bune imunoscopia electronică (IME), analiza radioimună (ARI), colorația imunofluorescentă (IF), testul ELISA, contraimmunoelectroforeza (CIE). Metodele enumerate sunt avantajoase, sensibile și accesibile. Descriem mai jos principiile acestor tehnici și particularitățile lor.

Imunoscopia electronică. Într-un prim timp suspensia virală (e. g. omogenatul prelevatului patologic) este tratată cu ser antiviral de complementat, prin încălzire 30

minute la 56°C, pentru a evita «viroliza». Reacția antigen-anticorp aglomerează virionii și ameliorează mult concentrarea lor pe grila suport pentru examinare (formvar, carbon). În următorul timp se colorează negativ virionii cu acid fosfotungstic (revedi partea întâi, 4.4.1). Se evidențiază astfel morfologia virionilor cu multe detalii de suprafață.

Utilizarea anticorpilor marcați cu feritină, peroxidază sau, mai bine, cu aur coloidal ameliorează de asemenea studiul la nivel ultrastructural al virionilor concentrați.

Se utilizează IME pentru depistarea în produsul biologic a adenovirusurilor în țesutul amigdalelor, entero- și rotavirusurilor în materiile fecale, virusului varicelei în detritusul variolic, poliovirusurilor, citomegalovirusului, virusurilor hepatitelor A și B. Metoda permite diferențierea virusurilor respiratorii din familia *Orthomyxoviridae* (virus gripal tip A, B, C) și *Paramyxoviridae* (paramixovirus tip 1, 2, 3, 4, rujeolic, respirator, sincițial).

Analiza radioimună. Pentru evidențierea antigenului viral, se amestecă materialul de examinat cu antiser specific de referință. Peste un timp se adaugă antigen omogen marcat cu izotopi radioactivi (^3H , ^{125}I , ^{14}C). Dacă antigenul marcat nu se cuplează, reacția este considerată pozitivă, din cauză că antigenul examinat s-a cuplat cu anticorpul specific din serul de referință. În reacția negativă antigenul marcat se va cupla cu serul de referință omolog.

Pentru efectuarea ARI se folosește o aparatură specială radiometrică, cu ajutorul căreia se măsoară radioactivitatea complexului antigen-anticorp.

Antigenul este imobilizat în fază solidă (pe un suport insolubil, ca mărgelile din polistiren, pe pelicule din diverși polimeri sintetici, pe suprafața godeurilor sau pe peretele eprubetei).

Frecvent este utilizată ARI directă sau tehnica «în sandwich». În acest caz antigenul din proba de examinat se cuplează cu anticorpul specific imobilizat pe suport și gradul de cuplare se determină cu alți anticorpi specifici marcați radioactiv. Radioactivitatea rămasă în faza solidă după spălare este echivalentă cu cantitatea de antigen din proba examinată.

ARI este utilizată pentru depistarea antigenului superficial al virusului hepatitei B (AgHBs) și anticorpilor anti-HBs în diagnosticul hepatitei virale B, precum și pentru identificarea într-un amestec a unor antigeni, hormoni, enzime etc.

Este o metodă foarte sensibilă, dar are dezavantajul manipulării cu reactivi marcați cu izotopi radioactivi și, respectiv, necesității laboratoarelor cu utilaje pentru măsurarea radioactivității.

Colorația imunofluorescentă. Se folosește în două variante, directă și indirectă, pentru depistarea virusului în prelevate patologice, în culturi de celule infectate, în organismul animalelor. În acest scop se utilizează conjugate imunofluorescente (cu izotiocianat de fluoresceină, rodamină).

Tehnica montării IF în ambele variante este descrisă în partea întâi, 10.2.2.5.

IF se folosește cu succes pentru diagnosticul rapid al gripei, paragripei, infecțiilor adenovirale, enterovirale, rujeolei, oreionului, rabiei, hepatitelor, varicelei, infecției cu rotavirusuri ș. a., prin examinarea preparatelor din cele mai diverse prelevate patologice.

ELISA este metoda anticorpilor marcați cu enzime (peroxidaza din hrean, fosfatasa alcalină). Actualmente se utilizează reacția imunoenzimatică pe fază solidă (revedi partea întâi, 10.2.2.5). Sensibilitatea și specificitatea ei cresc prin utilizarea anticorpilor monoclonali. Dă rezultate deosebite în diagnosticul rapid al infecției herpetice (herpesvirus tip 1 și 2), cu citomegalovirus, rabiei, virozelor respiratorii, rujeolei, infecției cu virusuri

Coxsackie B, hepatitei virale B, în diagnosticul infecțiilor virale cronice, persistente și lente.

Contrainmunoelectroforeza (revedi partea întâi, 10.2.2.1). Deși este reacția cea mai puțin sensibilă, se mai folosește încă pentru depistarea AgHBs în serurile bolnavilor cu hepatită B, precum și pentru depistarea altor antigeni virali cu încărcătură electrică negativă.

42.2. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA VIRUSURILOR

În majoritatea cazurilor concentrația virusului în produsul patologic este insuficientă pentru decelarea directă a lui sau a antigenilor și atunci se recurge la izolarea virusului, identificat ulterior prin diferite metode.

Izolarea virusurilor se efectuează în următoarele scopuri:

- Determinarea tipului și variantei unui virus circulant în populație când se examinează infecții sporadice, izbucniri epidemice și epidemii.
- Diagnosticul virozelor care impun măsuri urgente antiepidemice (e. g. confirmarea diagnosticului gripei, poliomielitei, encefalitei indică și orientează imunizarea populației).
- Diagnosticul infecțiilor cauzate de noi serovaruri de virus necunoscute anterior.
- Depistarea virusurilor ca indicatori de poluare microbiologică a unor elemente din mediul ambiant.

Pentru izolarea virusurilor este important ca produsul patologic de la bolnav să fie recoltat cât mai precoce posibil, respectând regulile de asepsie, care evită contaminarea bacteriană, precum și infectarea personalului. Probele se transportă în container cu zăpadă carbonică.

Dacă probele nu pot fi examinate imediat, trebuie congelate la -70°C . Deseori se folosesc medii de transport cu antibiotice pentru inhibarea florei de contaminare.

Se examinează spălături nazofaringiene, materii fecale, lichid cefalorahidian, conținutul veziculelor, al pustulelor ș. a.

Diagnosticul virusologic are trei etape:

- izolarea virusului;
- urmărirea reproducerii;
- identificarea.

1. Izolarea virusului se efectuează în funcție de particularitățile agentului etiologic prezumtiv și posibilitățile laboratorului. Virusurile pot fi izolate:

- în culturi de celule;
- în ouă embrionate de găină;
- în organismul animalelor receptive de laborator.

Izolarea virusului în culturi de celule. În 1948—1952 a fost demonstrată posibilitatea cultivării celulelor de mamifere *in vitro* și astfel a apărut ideea, ulterior confirmată, că virusurile se pot replica (reproduce) în afara organismului animal (Carrel, Enders, Weller, Robins).

Pentru diagnosticul de laborator al virozelor se utilizează culturile în strat monocelular. Sunt cunoscute 3 tipuri de culturi de celule: primare, diploide și continui sau linii celulare (stabile).

Culturile primare se obțin direct din țesuturile animalului sau ale omului prin dezagregare tisulară cu ajutorul enzimelor proteolitice (tripsina, colagenaza ș.a.). Celulele dispersate, introduse în mediul nutritiv au capacitatea de a se fixa pe suprafața internă a recipientului de cultivare și de a se multiplica. Le putem obține din orice țesut embrionar de la animal sau om, deoarece celulele embrionare posedă o capacitate considerabilă de creștere și multiplicare. Mai frecvent culturile de celule primare se pregătesc din amestec de țesut osos, dermal, muscular.

Celulele culturilor primare, de regulă, își pot păstra viabilitatea câteva generații (5—6 pasaje).

După câteva pasaje ale culturii primare, uneori se formează așa-numita *cultură diploidă*, populație de celule fibroblastoide, care au capacitate sporită de multiplicare: suportă până la 30—60 pasaje, păstrând completul inițial de cromozomi.

Celulele diploide umane sunt foarte sensibile față de mai multe virusuri și se utilizează larg în virusologie.

S-au obținut culturi de celule diploide de origine umană, bovină, porcină, ca tulpinile WI-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90 ș.a.

Culturile continui sau liniile celulare sunt stabile și pot suporta un număr nelimitat de pasaje. Ele provin din culturi de celule primare în urma variabilității genetice în procesul cultivării.

Linii celulare au fost obținute din diverse țesuturi normale și canceroase de la om: din amnios (A-0, A-1, FI), rinichi (Rh, REU), carcinomul colului uterin (HeLa), o tumoră canceroasă a laringelui (Hep-2), din măduva osoasă a unui bolnav de cancer pulmonar (Detroit-6), rhabdomyosarcom de embrion uman (RD) ș.a. Ele se conservă congelate în azot lichid.

Cultivarea celulelor se efectuează în recipiente de sticlă sau masă plastică transparentă de diverse forme și dimensiuni, iar mediile de cultură utilizate conțin aminoacizi, vitamine, factori de creștere. Asemenea medii larg utilizate în virusologie sunt: 199, Eagle, hidrolizat de lactalbumină ș.a.

După destinație, mediile nutritive se divizează în medii de creștere și de întreținere.

Mediile de creștere, îmbogățite 2—30% cu seruri obținute de la om sau animale, se utilizează pentru cultivarea celulelor.

Mediile de întreținere se utilizează pentru păstrarea monostratului celular în procesul infectării cu virus. Aceste medii nu conțin ser sau îl conțin în cantități foarte mici. În medii se adaugă indicatorul roșu fenol, care virează la galben, dacă mediul devine acid.

Prepararea suspensiei de celule. Țesutul, spălat în soluția Hanks, se mărunțește cu foarfecele, apoi se adaugă 200—300 ml soluție de tripsină la 100 g țesut și se omogenizează amestecul în termostat pe un agitator magnetic.

Se centrifughează 5—10 minute suspensia de celule la 600 rpm. Se decantează supernatantul, se resuspendează sedimentul în mediu nutritiv și se determină concentrația celulelor în camera Gorjaev. Se diluează suspensia celulară cu mediul nutritiv până la concentrația de 400 000—800 000 celule/ml, apoi se repartizează în recipiente, care se închid cu dopuri de cauciuc și sunt termostatare pentru cultivare la 35—37°C timp de 48—96 ore, înclinate sub un unghi de 5°.

Pentru izolarea virusurilor se aleg eprubete cu un monostrat bine format, se decantează mediul nutritiv și se spală celulele de câteva ori cu soluție Hanks, pentru înlăturarea

anticorpilor din ser și a inhibitorilor. Apoi în fiecare eprubetă se inoculează câte 0,1—0,2 ml din materialul de examinat. După 30—60 minute de la inoculare se pipetează în eprubete câte 1 ml din mediul de întreținere și se introduc eprubetele în termostat la 37°C.

Urmărirea virusurilor în culturile de celule se face prin observarea efectului citopatic (ECP), prin reacția de hamadsorbție, prin fenomenul de interferență ș. a.

■ *Efectul citopatic (ECP).* Multiplicarea virusurilor în culturi de celule cauzează, de regulă, modificări degenerative și distrugere celulară, fenomen ce se numește efect citopatic. Asemenea virusuri sunt citopatogene. Efectul citopatic al virusurilor se manifestă prin rotunjire sau retracție celulară, dezintegrări ale organelor celulare, apariția vacuolelor sau a granulelor în citoplasmă, picnoză nucleară, dezvoltare de incluziuni, fuziunea citoplasmelor cu formare de sinciții. Aceste modificări pot fi studiate la microscop pe celule vii necolorate. Deosebim ECP difuz, când celulele afectate sunt răspândite pe toată pânza de celule și ECP în focar, când între aglomerările de celule alterate rămân multă vreme zone de celule normale. Informații mai detaliate obținem prin colorația Giemsa, cu hematoxilineozină, cu acridină oranj.

Unele virusuri produc un ECP minim (greu diferențiat de alterările din culturile celulare vechi), altele se multiplică fără a produce ECP. În aceste cazuri detectăm prezența virusului prin alte metode, ca hemadsorbția, interferența.

■ *Hemadsorbția (HAds)* permite depistarea virusului, chiar înainte de dezvoltarea ECP, datorită apariției antigenului viral specific pe suprafața celulei infectate.

La cultura de celule (de control și infectată cu virus), după o perioadă de incubare, în funcție de virus, se adaugă 0,2 ml suspensie 0,5% de eritrocite, pentru a acoperi monostratul celular, și se menține 15—20 minute la temperatura de 4°C, 20°C sau 37°C, caracteristică pentru fiecare virus. Apoi se agită eprubetele, pentru a înlătura eritrocitele neadsorbite și se urmărește la microscop, cu obiectivul mic, aglomerarea eritrocitelor pe celule aparte sau pe tot monostratul celular.

■ *Interferența.* Unele virusuri (e. g. virusul ruzelei) nu produc ECP, dar determină un fenomen de interferență. Astfel pentru detectarea virusului ruzeolic se infectează cultura de celule cu un virus citopatogenic. Lipsa multiplicării acestui virus confirmă cu mare probabilitate prezența în cultură a virusului ruzeolic.

■ *Formarea de plaje.* Plajele sau coloniile negative sunt focare de celule alterate de virus în monostratul celular acoperit cu agar. Focarele de degenerare celulară, plajele, se pun în evidență prin colorarea cu roșu neutru: celulele distruse nu se colorează și le observăm ca pete incolore pe fondul roșu-roz al monostratului celular. Există și alte modalități de evidențiere a plajelor virale. Numărătoarea plajelor permite cuantificarea virusului infectant.

■ *Proba culorii.* În urma activității vitale a celulelor în mediul nutritiv se concentrează produse acide care modifică pH-ul (culoarea mediului trece din roșu în oranj-galben). Metabolismul celulelor infectate cu virusuri citopatogene este inhibat și pH-ul mediului nu se modifică (mediul păstrează culoarea roșie).

Izolarea virusurilor în ouă embrionate de găină. Virusurile se cultivă pe embrioni de găină de 6—15 zile. Aceștia sunt un sistem de celule constituit din țesuturi în dezvoltare, cu multiplicare activă, practic steril, lipsit de mijloacele apărării antiinfecțioase proprii animalelor adulte.

Pentru cultivare se inoculează, cu seringă, produsul de examinat în cavitatea amniotică sau alantoidiană, în sacul vitelin ori pe membrana corioalantoidiană.

Infecțarea membranei corioalantoide (MCA). Se antisepticizează coaja oului cu iod și alcool, se perforază camera cu aer și, cu seringă, se depune pe MCA 0,1—0,2 ml din produsul patologic. Se obturează apoi orificiul din coajă cu parafină sterilă și se introduc embrionii în termostat în poziție orizontală.

Infecțarea cavității alantoide. Se injectează materialul examinat, printr-un orificiu lateral al cojii, la adâncimea de 10—15 mm.

În cavitatea amniotică se injectează produsul examinat prin orificiul din partea bună a oului, îndreptând acul spre corpul embrionului.

Se parafinează orificiile de injectare și se incubează embrionii în termostat la temperatura de 35—37°C timp de 48—72 ore, în funcție de virus. Se răcesc apoi ouăle 18 ore la +4°C pentru o vasoconstricție maximă și, aseptice, se taie coaja pentru acces la embrion. Se recoltează cu seringă lichidul alantoidic sau amniotic, iar membranele și embrionul se introduc în cutii Petri sterile.

Urmărirea virusului în embrionul de găină se poate face după unul din efectele replicării sale:

■ **Leziuni focale pe MCA:** pete alburii, bombate, cu un diametru de 1—2 mm, numite *pock-uri*.

■ **Moartea embrionului.**

■ **Apariția de hemaglutinine** în lichidul alantoidian sau amniotic.

Reacția de hemaglutinare (RHA) este bazată pe capacitatea unor virusuri de a aglutina eritrocitele anumitor specii de mamifere sau păsări. Se efectuează calitativ sau cantitativ:

— reacția calitativă (de orientare) se face pe lamă;

— reacția cantitativă, prin care se află concentrația (titrul) virusului, se face prin diluții în tuburi sau pe plăci din material plastic cu godeuri.

Titrul virusului este diluția maximă a lichidului care aglutinează eritrocitele cu intensitatea +++ (vezi mai jos). Aceasta este o unitate hemaglutinantă (UHA).

Se efectuează diluții duble ale lichidului de examinat în 0,5 ml soluție salină izotonă. Apoi în toate eprubetele se adaugă câte 0,5 ml suspensie 1% de hematii, spălate de 3 ori cu soluție salină izotonă. Pentru control se amestecă 0,5 ml hematii cu un volum egal de diluant. În funcție de virus (caracterele hemaglutininei), incubarea amestecului se face la 37°, 20° sau 4°C.

Rezultatele reacției se citesc după 30—60 minute și sunt apreciate cu plusuri: «++++» — hematii aglutinate complet într-o peliculă depusă pe tot fundul eprubetei sau godeului, cu margini festonate («umbrelă»); «+++» — peliculă de hematii neuniformă; «++» — hematii sedimentate și peliculă de aglutinat puțin pronunțată; «+» — un sediment floconos; «—» — hematii sedimentate în buton bine conturat identic cu cel din control (martor).

Izolarea virusurilor pe animale de laborator. Animalele de laborator se folosesc în virusologie cu următoarele scopuri:

■ diagnosticul infecțiilor virale;

■ obținerea serurilor imune antivirale;

■ reproducerea infecțiilor virale pentru studierea patogeniei, imunității, morfopatologiei etc. (modele experimentale);

■ elaborarea metodelor specifice și nespecifice de profilaxie și tratament.

Experimentarea pe animale de laborator este costisitoare și are o serie de dezavantaje: unele infecții nu pot fi reproduse, infecții latente reactivate prin inocularea animalelor ș.a. De aceea această metodă, când este posibil, se înlocuiește cu tehnici mai economice, mai rapide, cu rezultate constante.

Mai frecvent se utilizează șoareci nou-născuți.

Regulile de lucru cu animalele de laborator în infecții virale sunt identice cu cele din infecțiile bacteriene.

2. **Identificarea virusurilor** se efectuează cu ajutorul serurilor specifice antivirale în reacția de neutralizare (RN), reacția de inhibare a hemaglutinării (RIHA), reacția de inhibare a hemadsorbției (RIHAds), reacția de imunodifuzie (RID), reacția de fixare a complementului (RFC), testul ELISA, ARI ș.a.

Reacția de neutralizare se bazează pe neutralizarea, în sisteme vii, receptivă, a acțiunii infecțioase și citopatice a unui virus dat. Ca sistem biologic pot servi culturile de celule, oul de găina embrionat, animalele de laborator.

Din materialul ce conține virus se pregătesc diluții succesive la care se adaugă ser specific diluat conform titrului indicat pe eticheta fiolei. Cu amestecul incubat 30—60 minute la 37°C se infectează sistemul biologic.

Drept control servește același sistem biologic infectat cu virus în amestec cu ser normal.

Se apreciază RN ca pozitivă dacă în culturile de celule lipsește ECP, nu apar modificări în embrionul de găină, animalele receptivă nu se îmbolnăvesc și nu mor.

Pe baza rezultatelor RN se calculează *indicele de neutralizare*: raportul dintre titrul virusului în sistemul de control (unde se mai produce ECP ș.a.) și titrul virusului în experiment. Indicele de neutralizare mai mic de 10 semnifică o reacție negativă; de la 11 la 49 o reacție echivocă, iar mai mare de 50 o reacție pozitivă. Prin RN se apreciază cu certitudine specia și serovarul virusului izolat.

Reacția de inhibare a hemaglutinării se bazează pe inhibarea hemaglutininei virale de către anticorpii specifici din serul imun; în consecință aglutinarea eritrocitelor nu se mai produce. Reacția se efectuează în eprubete sau pe plăci din masă plastică cu godeuri.

Se pregătesc diluții duble succesive ale serului imun de referință în volume de 0,25 ml, conform titrului indicat pe etichetă. Apoi la fiecare diluție se adaugă câte 0,25 ml antigen (material virotic) titrat în doza de lucru (8 UA/0,25 ml). După ce se menține amestecul o oră la temperatura camerei, se pipetează în fiecare eprubetă (godeu) câte 0,25 ml suspensie 0,5% de eritrocite.

Se citesc rezultatele după 1—2 ore de păstrare a reacției la temperatura camerei.

Însotim reacția cu următorii martori:

- al eritrocitelor: 0,5 ml soluție salină izotonă + 0,25 ml suspensie 0,5% de eritrocite;
- al serului: 0,25 ml ser imun de referință + 0,25 ml soluție salină izotonă + 0,25 ml suspensie eritrocitară;
- al specificității antigenului: 0,25 ml antigen + 0,25 ml ser de referință + 0,25 ml suspensie eritrocitară.

Reacția de inhibare a hemadsorbției. Sub acțiunea serului imun specific, virusul hemadsorbant din cultura de celule este blocat și la adăugarea eritrocitelor acestea nu mai sunt adsorbite pe suprafața celulelor infectate.

Din tuburile cu celule infectate, se varsă mediul de întreținere și se spală cultura de celule cu soluție Hanks, pentru a îndepărta substanțele proteice ale mediului, apoi se adaugă câte 0,2 ml ser imun antiviral diluat 1:5 și 1:10, după care se mențin eprubetele înclinate 15—20 minute la temperatura camerei. În final se adaugă câte 0,2 ml suspensie 0,5% de eritrocite. În tuburile de control se introduce ser normal și suspensie eritocitară. După 20—30 minute de incubare la temperatura optimă pentru hemadsorbție, citim rezultatele.

Specia virusului se apreciază pe baza lipsei adsorbției eritrocitelor în tuburile de experiență în prezența hemadsorbției în tuburile de control.

Alte reacții utilizate pentru identificarea virusurilor, RFC, RID, ELISA, ARI au fost descrise în alte capitole și detaliile lor tehnice nu diferă în virologie.

42.3. METODELE SEROLOGICE ÎN DIAGNOSTICUL VIROZELOR

Metodele serologice, bazate pe reacțiile antigen-anticorp, au largă răspândire în diagnosticul virozelor. Ele sunt simple, standardizate și permit examinarea unui număr considerabil de probe într-un timp relativ scurt.

Folosim aceleași reacții descrise pentru identificarea virusurilor izolate și, cu ajutorul unor baterii de antigeni virali, putem determina creșterea titrului de anticorpi specifici în serurile perechi (recoltate la debutul bolii și după 2—4 săptămâni).

Mai răspândite în serodiagnosticul virozelor sunt: RFC, RIHA, RN, RIHAds, ELISA, ARI, RIF.

Se examinează serurile perechi în paralel, începând cu diluția 1:10. Semnificativă pentru o infecție recentă este creșterea titrului anticorpilor specifici de cel puțin 4 ori în serul al doilea față de primul.

Anticorpii din clasa IgG sunt depistați după 2 săptămâni de la debutul virozei și persistă timp îndelungat, pe când cei din clasa IgM apar precoce (în zilele 3—5 de boală) și dispar peste câteva săptămâni. De aceea depistarea anticorpilor IgM dovedește cert că este vorba de o infecție recentă, chiar dacă examinăm un singur ser prelevat în perioada acută a bolii. Metodele actuale permit identificarea anticorpilor din clasa IgM utilizând seruri specifice anti-IgM.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL GRIPEI

43.1. DATE GENERALE

43.1.1. O minidefiniție

Virusurile gripale au virion sferic (ocasional filamentos la primele pasaje în embrionul de găină), cu diametrul de 80—120 nm. Nucleocapsida helicală este inclusă într-o anvelopă derivată din membrana celulei gazdă, în care sunt înfipite radiar două tipuri de glicoproteine virale: hemaglutinina (H) și neuraminidaza (N). Genomul ARN m.c. liniar «-», are asociată o transcriptază și este fragmentat în 7 sau 8 segmente, fiecare reprezentând o genă.

Sunt sensibile la eter și dezoxicolat de sodiu.

43.1.2. Reper taxonomice

Virusurile gripale sunt incluse în familia *Orthomyxoviridae* (gr. *orthos* = drept, corect; *myxo* = mucus; adevăratele mixovirusuri), care cuprinde două genuri:

■ *Influenzavirus* cu două specii: *virusurile gripale tip A și tip B*, care au genom cu 8 segmente;

■ *Mesainfluenzavirus* cu o singură specie: *virusul gripal tip C*, care are genomul numai cu 7 segmente, pentru că o singură glicoproteină funcționează ca ligand și enzimă de distrugere a receptorilor celulari (vezi mai jos).

Diferențierea tipurilor de virus gripal se face uzual prin RFC cu antigenul nucleocapsidic.

Conform nomenclaturii Comitetului de experți al O.M.S. (1980), virusurile gripale de tip A se diferențiază în 13 subtipuri după hemaglutinină (H1—H13) și în 10 subtipuri după neuraminidază (N1—N10). Astfel există subtipurile de virus gripal A numite: H1N1; H2N2; H3N2.

43.1.3. Habitat

Virusul gripal tip A infectează omul, unele mamifere (porci, cai) și păsări (rațe ș.a.), iar între tulpinile umane și animale se produc reasortări genice. Tipurile B și C sunt specific umane.

43.1.4. Factori de patogenitate

Hemaglutinina funcționează ca ligand la receptori ai epiteliului respirator, care conțin acid sialic. Neuraminidaza hidrolizează stratul de mucus și deschide acces virionilor spre receptori epiteliali. Prin capacitatea lor de hidroliză acidul sialic din glicocalixul celulei gazdă, neuraminidazele joacă de asemenea rol în eliberarea virionilor din celula care i-a replicat și previn autoaglutinarea virionilor prin distrugerea resturilor de acid sialic din anvelopa virală.

Fenome de sensibilizare de tip Arthus sunt posibile la nivel pulmonar după infecții consecutive, apropiate în timp, cu variante antigenice ale virusului de tip A.

43.1.5. Receptivitatea la infecția cu virusurile gripale

Receptivitatea la infecția cu virusurile gripale este generală.

43.1.6. Gripa

Gripa este o infecție a tractusului respirator, care survine, epidemic sau pandemic. Boala apare după o incubatie de 1—2 zile. Obişnuit virusul este prezent în nazofaringe 1—2 zile înainte și 1—2 zile după debutul bolii. Bolnavii au frisoane, febră, stare de rău, dureri musculare, prostrație și semne de inflamație a căilor respiratorii, uneori discrete. Deosebim următoarele forme clinice ale bolii:

- gripa tipică (cu sau fără complicații);
- forme atipice (afebrile, acatarale, fulgerătoare).

După gravitatea evoluției distingem forme ușoare, medii și severe.

43.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A GRIPEI

43.2.1. Diagnosticul direct

43.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează exsudatul nazofaringian, prelevat în primele 3 zile de boală pe tampon de vată și amprente de pe mucoasa nazală, iar în cazuri letale, fragmente din țesutul pulmonar și raclatul de pe mucoasa traheobronșică.

43.2.1.2. Diagnosticul rapid

Diagnosticul rapid se bazează pe depistarea antigenului viral, mai eficient prin imunofluorescență, în amprente de mucoasă nazală sau în celulele epiteliale din secreția nazofaringiană. Se utilizează, pentru metoda directă sau indirectă, imunoglobuline fluorescente comerciale. Antigenul specific apare în citoplasmă cu aspect de conglomerate care iluminează clar.

Este recomandat și *rinocitodiagnosticul*. În acest scop se prelevă amprente de pe

mucoasa cornetelor nazale pe lame înguste de 5×100 mm, groase de 1,5 mm (se pot folosi și lame din plastic transparent), care se introduc în cavitatea nazală. Se efectuează extemporaneu și frotiuri din exsudat nazal prelevat pe tampon. Preparatele microscopice se usucă la temperatura camerei și se mențin în baia de colorant (200 ml apă distilată, 0,1 ml soluție saturată de fucsină bazică în alcool metilic și 0,4 ml soluție saturată de albastru de metilen tot în alcool metilic) 10—15 minute. Se spală și se examinează microscopic.

Incluziunile virale din citoplasmă apar colorate în roșu ca formațiuni mici, sferice. Citoplasma și nucleul celulelor se colorează în albastru-violet.

În ultimul timp este preferat testul ELISA pentru punerea în evidență a antigenilor specifici de tip.

43.2.1.3. Izolarea virusului

Metoda de bază pentru izolarea virusului gripal din exsudatul (sau lichidul de spălătură) nazofaringian este infectarea embrionilor de găină în vârstă de 10—11 zile.

Virusul gripal tip B se dezvoltă preferențial în culturi de celule din rinichi de maimuță sau embrion uman.

Pentru inhibarea florei bacteriene, se tratează materialul de examinat cu antibiotice (500—1000 UI/ml penicilină și 200 μ g/ml streptomycină).

Se injectează volume de 0,2 ml prelevat în cavitatea amniotică și alantoidiană la cel puțin 5 embrioni, care se incubează la 37°C timp de 3—4 zile. După incubare, se răcesc embrionii 2—4 ore în frigider, apoi se aspiră lichidul amniotic sau alantoidian cu seringă sau cu pipeta Pasteur.

Acumularea virusului în embrionul de găină se testează prin RHA pe lamă sau în tuburi cu suspensie 1% de eritrocite de găină.

Virusul izolat se identifică prin RIHA, RIHAds (cu suspensie 0,4% eritrocite de cobai, dacă am izolat virusul în culturi de celule), RN, RFC.

43.2.2. Diagnosticul serologic

Examenul serologic este o metodă retrospectivă, care confirmă diagnosticul de gripă când depistează creșterea de cel puțin 4 ori a titrului anticorpilor în serul bolnavului.

Uzual se examinează seruri perechi: primul recoltat în perioada acută de boală (până la 3—5 zile), iar al doilea după a 10-a zi de boală. Serurile se testează în paralel. Pentru aceasta, primul ser îl conservăm la -20°C până în momentul testării.

Se efectuează RFC, RIHA, ELISA sau RN. La efectuarea RIHA întotdeauna se ia precauția de a distruge inhibitorii nespecifici ai hemaglutinării prin tratarea serurilor cu neuraminidază de vibron holeric urmată de inactivare timp de o oră la 60°C în baie de apă.

43.2.3. Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament

■ Seruri antigripale specifice de tip A, B, C și subtipuri A (H1N1, H2N2, H3N2) pentru identificarea virusurilor gripale prin RFC, RIHA ș.a.

- Antigeni specifici de tip și subtip pentru serodiagnosticul gripei.
- Vaccin viu antigripal preparat din lichidul alantoidian al embrionului de găină infectat cu tulpini vaccinale.
- Ser polivalent antigripal obținut prin hiperimunizarea căilor cu virusuri gripale de diferite tipuri. Se produce liofilizat în combinație cu antibiotice și sulfamide. Se administrează intranasal pentru profilaxie și tratamentul bolii.
- Imunoglobulină umană hiperimună antigripală obținută de la donatori imunizați cu vaccin viu antigripal de tip A și B. Se administrează intramuscular pentru profilaxia și tratamentul gripei în focare.
- Interferon leucocitar uman pentru profilaxie.
- Amantadină și rimantadină cu acțiune terapeutică la începutul bolii.
- Unguent cu 0,1—0,5% oxolină pentru administrare intranasală; antigripină în varianta pentru copii și adulți.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE UNELE PARAMIXOVIRUSURI

44.1. DATE GENERALE

44.1.1. O minidefiniție

Paramixovirusurile (gr. *para* = alături) au virionul aproximativ sferic, cu diametrul cuprins între 80—150 nm, în funcție de gen. Nucleocapsida helicală este inclusă într-o anvelopă lipoproteică cu glicoproteine virale înfipte radiar. Activitatea hemaglutinantă și neuraminidazică variază cu genul (vezi mai jos). Genomul este ARN m.c. liniar «+» sau «-».

Sunt sensibile la eter și dezoxicolat de sodiu.

44.1.2. Reper taxonomice

Paramixovirusurile constituie familia *Paramyxoviridae*, care are trei genuri:

- *Paramyxovirus* cu specii mai importante: *virusul paragripal* și *virusul urlian*;
- *Morbilivirus* cu specia tip *virusul rujeolic*;
- *Pneumovirus* cu specia tip *virusul respirator sincițial*.

Virusul paragripal are 4 serovaruri (1—4), celelalte specii sunt antigenic omogene.

La genul *Paramyxovirus* aceeași glicoproteină de înveliș are activitate hemaglutinantă și neuraminidazică; genul *Morbilivirus* este numai hemaglutinant, iar genului *Pneumovirus* îi lipsește atât hemaglutinina, cât și neuraminidaza.

44.1.3. Habitat

Virusurile paragripale (1—4), urlian, rujeolic și respirator sincițial sunt specii umane. Toate genurile au și specii cu gazde animale.

44.1.4. Factori de patogenitate

Hemaglutinina este unul dintre liganzii paramixovirusurilor la epiteliul respirator. Neuraminidaza, când există, favorizează accesul virionilor la receptorii epiteliali. Virusurile rujeolic și urlian depășesc bariera hematobronhoalveolară și, antrenate de curentul sanguin, atacă numeroase alte organe țintă.

44.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu paramixovirusuri

Receptivitatea la infecțiile cu paramixovirusuri este generală.

44.1.6. Infecții determinate de paramixovirusuri

Paragripa este o boală respiratorie acută, cauzată de virusul paragripal, caracterizată prin febră, intoxicare moderată a organismului și afectarea laringelui și bronhiilor. În primul an de viață infecția evoluează grav: laringotraheită cu crup (în special serovarul 2) sau bronșiolite cu pneumonii interstițiale (în special serovarul 3). Infecțiile cu serovarul 4 sunt rare și benigne.

Rujeola este o boală acută infecțioasă caracterizată prin febră, intoxicare, afectarea conjunctivelor și tractusului respirator superior cu exantem maculopapulos tipic. În evoluția clinică a rujeolei deosebim:

- stadiul preeruptiv (perioada catarală), în care apare enantemul rujeolic sub aspect de pete mici roșii situate pe mucoasa palatului moale, dur, pe obraji;
- perioada eruptivă, când elemente maculopapulare, catifelate, apar de obicei într-o succesiune centrifugă: inițial după urechi și pe ceafă, pe frunte și obraji, coborând spre gât. În a doua zi erupția se extinde pe torace, coapse, mâini, iar în a 3-a zi pe gambe, tălpi;
- perioada posteruptivă (convalescentă).

Virusul se elimină prin secrețiile nazofaringiene și oculare. Pacienții sunt contagioși cu cca 3 zile înainte de debutul bolii până la aproximativ 5 zile după apariția erupției.

Virusul rujeolei poate produce infecție persistentă necitocidă, care, când evoluează la nivelul encefalului, determină reacții de sensibilizare demielinizante, cauză a *panencefalitei sclerozante subacute*.

Oreionul sau parotidita epidemică este o boală infecțioasă acută, determinată de virusul urlian, caracterizată prin afectarea glandelor salivare, altor glande și sistemului nervos, cu febră și intoxicare.

Infecțiile determinate de virusul respirator sincițial la sugari evoluează cu bronșiolită și pneumonie interstițială. La adult determină «răceala banală» (guturai).

44.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A PARAGRIPEI

Prelevatul patologic, lichidul de spălare nazofaringiană sau exsudatul nazal, nu trebuie congelat. În caz de temporizare a examenului îl conservăm cu un volum egal de glicerină 50% tamponată la pH 7,2.

O *metodă rapidă* și practică este identificarea antigenului viral în secrețiile respiratorii prin imunofluorescență sau testul ELISA.

Izolarea virusului se face în culturi de celule primare din rinichi de maimuță sau embrion uman. Se urmărește apariția și caracterul efectului citopatic: virusurile serovarurilor 1 și 4 cauzează apariția de celule granulare, care se desprind de pe sticlă cu rarefierea monostratului celular; serovarurile 2 și 3 formează sinciții.

Identificarea serovarurilor izolate se face prin RN, RIHAds cu eritrocite de cobai.

Reacțiile serologice cu seruri pereche pun în evidență anticorpii neutralizanți, fixatori de complement, hemaglutinoanizanți respectiv în RN, RFC, RIHA. Sunt utile numai

pentru diagnosticul retrospectiv. Criteriul diagnostic este creșterea de cel puțin 4 ori a titrului de anticorpi față de unul din cele 4 tipuri de virus în serul al doilea.

Preparate biologice utilizate în diagnostic, profilaxie și tratament:

- Seruri antiparagripale pentru diferențierea serovarurilor.
- Antigeni paragripali liofilizați pentru serodiagnostic.
- Imunoglobulină placentară pentru imunizare pasivă în colectivități de copii. Se administrează 3—6 ml intramuscular când apar cazuri de paragripă.

Cercetări pentru un vaccin atenuat antiparagripal sunt în curs.

44.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A RUJEOLEI

De obicei rujeola este diagnosticată ușor după tabloul clinic.

Prelevatele patologice de examinat sunt: lichidul de spălătură și exsudatul nazofaringian, sângele raclat din elementele eruptive cutanate.

Pentru *diagnosticul rapid* se urmărește antigenul viral în celulele epidermice la analiza raclatului din erupții prin metoda imunofluorescentă.

Este oportun examenul citologic al secreției nazale, prin care se pune în evidență celulele gigante multinucleate, caracteristice rujeolei, mai ales în perioada prodromală a bolii.

Izolarea virusului se face din spălătura nazofaringiană și din sânge în perioada prodromală și în primele zile după apariția erupției, prin inoculare în culturi celulare de linie continuă (L-41, Vero, HeLa, KB, MS, BSC1), din celulele amniosului uman (linia FL). După 72—96 ore, virusul rujeolic determină efect citopatic cu formare de sinciții gigante (până la 100 de nuclee) și cu incluziuni citoplasmice acidofile. Mai târziu se formează și incluziuni bazofile intranucleare, care nu conțin însă antigen și nu dau fluorescență.

Antigenul poate fi depistat după 36—48 ore de la infectarea celulelor, la început perinuclear, apoi și în incluziunile citoplasmice, iar în final difuz în toată citoplasma.

Identificarea virusului se efectuează prin colorație imunofluorescentă, RN sau RIHA cu suspensie 0,5% eritrocite de maimuță la temperatura camerei.

Diagnosticul serologic se face prin RN pe culturi de celule prin RFC și RIHA. RN se efectuează pe celulele Hep-1, Hep-2 sau KB, utilizând virus rujeolic adaptat la aceste culturi celulare și care le provoacă efect citopatic pronunțat.

În RFC se utilizează ca antigen extract de culturi celulare infectate și supuse unei triple congelări și decongelări.

Foarte utilă este determinarea anticorpilor IgM prin ELISA cu seruri anti-IgM. La 97% din pacienți după 5—7 zile de boală se evidențiază anticorpii IgM, care persistă până la 2 luni.

Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament:

- Conjugat fluorescent antirujeolic pentru depistarea antigenului prin imunofluorescență.

- Vaccin viu atenuat preparat din virus rujeolic cultivat pe ou embrionat sau pe celule renale de câine ori cobai inoculate cu tulpinile Edmonston B, Schwartz sau L₁₆. Se administrează o singură doză subcutanat la vârsta de 12 luni. La copiii seronegativi la vârsta de 6—7 ani, se repetă doza.

■ Imunoglobulina umană normală se administrează, în doză de 1,5—3,0 ml, pentru profilaxia pasivă a contactărilor receptivi (nevaccinați).

44.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A OREIONULUI

Prelevatele patologice examinate sunt: saliva, lichidul cefalorahidian, urina.

Izolarea virusului se face în oul embrionat de găină și pe culturi de celule.

Utilizăm ouă embrionate de 7—8 zile, pe care le infectăm în cavitatea amniotică, apoi le incubăm 6—7 zile la 35°C. Virusul poate fi depistat în lichidul amniotic prin RHA cu eritrocite de găină.

Pentru izolarea virusului se folosește de asemenea culturi de celule din rinichi de maimuță, embrion uman, cobai sau celule HeLa. După 48—72 ore de la infectare, în culturile de celule apar celule gigante polinucleate și sinciții. RHAdS pune în evidență virusul.

Identificarea virusului izolat în embrioni de găină se face prin RFC, RIHA, iar a celui izolat pe culturi de celule prin RIF, RN, RIHAdS, RFC.

Serodiagnosticul permite determinarea creșterii titrului de anticorpi în seruri pereche. Se efectuează RFC sau RIHA folosind antigen liofilizat standard sau lichidul alantoidian ori amniotic din ouă embrionate infectate cu virusul urlian și cu activitate hemaglutinantă minimă de 1:16.

Din serurile bolnavilor trebuie înlăturați inhibitorii nespecifici ai hemaglutinării prin adsorbție cu caolin și masă eritrocitară 50%.

Creșterea de cel puțin 4 ori a anticorpilor în serul al doilea confirmă diagnosticul. De regulă, titrul anticorpilor în RIHA este de 1:320, iar în RFC de 1:64.

Pentru diagnosticul oreionului este recomandată și RN pe culturi de celule. În acest scop se amestecă diluții din serul bolnavului cu suspensia virală de referință. După incubare o oră la 37°C, se inoculează câte 0,2 ml din fiecare amestec în 4 tuburi de cultură. Se citește reacția după 6—7 zile de la contactul serului cu virusul. Are o eficiență de 75—85%, iar creșterea titrului de anticorpi este mai bine exprimată ca în RIHA.

Intradermoreacția. Ca alergen servește lichidul alantoidian, din oul embrionat infectat cu virus urlian, cu titrul hemaglutinant 1:128. Se injectează alergenul intradermic în doză de 0,1 ml. După 24—48 ore, la locul injectării apare hiperemie și infiltrat cu diametrul minim de 10 mm. Reacția se pozitivază tardiv, după 2—3 săptămâni de la debutul bolii.

Preparate biologice utilizate în diagnostic, profilaxie și tratament:

■ Antigen standard liofilizat pentru RIHA cu seruri perechi.

■ Vaccin antiurlian viu atenuat, obținut din tulpina L-3, pentru profilaxie. Se administrează o singură dată, subcutanat sau intradermic, la vârsta de 12 luni. Poate fi asociat cu vaccinul antirujeolic.

■ Imunoglobulină antiurliană pentru profilaxie pasivă în colectivități de copii.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTEROVIROZELOR

45.1. DATE GENERALE

45.1.1. O minidefiniție

Enterovirusurile (gr. *enteron* = intestin; virusuri care infectează intestinul, replicate de către enterocite) sunt virusuri nede cu dimensiuni reduse (22—30 nm) și simetrie icosaedrică, rezistente la cter și dezoxicolat de sodiu. La pH 3,0 își păstrează infecțiozitatea. Genomul ARN este monocatenar «+».

45.1.2. Repere taxonomice

Enterovirusurile constituie genul *Enterovirus* în familia *Picornaviridae*, din care mai fac parte alte genuri de virusuri care infectează omul: *Hepavirus*, agentul etiologic al hepatitei A (vezi capitolul următor), *Rhinovirus*, agenții etiologici ai guturaiului ș.a.

Genul *Enterovirus* include:

- virusul poliomielitei cu 3 serovaruri (1—3); ³⁰
- virusurile Coxsackie grup A cu 24 serovaruri (1—24) și grup B cu 6 serovaruri (1—6);
- virusurile ECHO¹ cu 34 serovaruri (1—34);
- enterovirusurile serovar 68—71.

45.1.3. Habitat

Gazdele naturale ale enterovirusurilor sunt primatetele.

45.1.4. Factori de patogenitate

Capsomerele funcționează ca liganzi la receptori celulari de pe enterocite, neuroni sau

¹

Sigla de la *Enteric Cytopathic Human Orphan* (orfane), pentru că inițial nu se cunoșteau sindroame clinice determinate de aceste virusuri.

alte țesuturi, care replică enterovirusuri. Receptorii pentru virusul poliomieltic par a fi codificați de o genă de pe cromozomul 19.

45.1.5. Receptivitatea la infecții cu enterovirusuri

Multe infecții cu enterovirusuri (cca 99%) evoluează inaparent, numai cu replicarea virusului în enterocite. Extinderea infecției la alte organe țintă cu boală manifestă este condiționată de factori insuficient cunoscuți, cum ar fi absența barierei anticorpilor umorali, leziunile terminațiilor nervoase la poarta de intrare (amigdalectomii etc.) pentru poliomielită.

45.1.6. Infecții determinate de enterovirusuri

Enterovirusurile determină o mare varietate de boli și sindroame clinice.

Poliomielita este o infecție virală acută caracterizată prin afectarea sistemului nervos (encefalul și măduva spinării) cu sau fără dezvoltarea ulterioară de paralizii de tip flasc. Mai frecvent se întâlnește serovarul 1. Forme clinice:

- forme neparalitice (infecție inaparentă, formă abortivă, formă meningiană);
- forme paralitice (spinală, bulbară, encefalitică).

Enterovirusul 71 determină izbucniri localizate de meningite și encefalite cu paralizii asemănătoare celor din poliomielită.

Spectrul clinic al *infecțiilor determinate de virusurile Cocksackie* variază de la manifestări minore la boli grave cu sfârșit letal. Bolile produse de diferitele serovaruri de virus Cocksackie sunt: herpangina, faringita acută limfonodulară, conjunctivita acută hemoragică, stomatita veziculoasă, boli ale aparatului respirator, rinofaringita, mialgia epidemică, miocardita interstițială, pericardita, meningita seroasă acută, encefalita, diareea acută, nefrita acută, boala febrilă cu exantem ș. a.

Manifestările clinice ale *infecțiilor cu virusuri ECHO* sunt de asemenea variate: meningită seroasă, encefalită, exantem infecțios, febră de trei zile, diaree acută.

45.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN POLIOMIELITĂ

Prelevatele patologice. Se examinează: materiile fecale și exsudatul sau spălătura nazofaringiană în prima săptămână de boală. În cazuri letale se prelevă material necroptic din encefal, măduva spinării, cerebel, mușchi, ganglioni limfatici, segmente din intestin. Probele tisulare necroptice se conservă în glicerină la 4°C.

Izolarea virusului se face în culturi de celule din rinichi de maimuță, embrion uman, pe celule HeLa. Prezența virusului se urmărește după proba culorii și efectul citopatic caracterizat prin rotunjirea, refringența și desprinderea celulelor de pe sticlă. Identificarea se efectuează prin RN pe culturi de celule, utilizând seruri standard specifice de serovar.

Serodiagnosticul poliomielitei. Se examinează seruri perechi: primul obținut la debutul bolii și al doilea peste 3—4 săptămâni, dar nu mai târziu de 30—40 zile de boală, pentru că după acest termen titrul anticorpilor nu mai crește.

Indicată și foarte sensibilă este RN cu tulpini de referință ale virusului poliomielit. Este recomandată de asemenea RFC. Semnificație diagnostică are numai creșterea de cel puțin 4 ori a titrului de anticorpi virus-neutralizanți sau fixatori de complement din al doilea ser.

Preparate biologice utilizate în diagnostic, profilaxie și tratament:

■ Seruri polivalente și monospecifice de serovar 1—3 pentru identificarea virusului poliomielitei.

■ Vaccinul viu atenuat, care conține tulpini de virus poliomielit de serovar 1—3. Se produce în stare lichidă și în formă de drajeuri pentru administrare per os.

■ Imunoglobulină umană standard și hiperimună antipoliomielitică pentru profilaxia și tratamentul poliomielitei.

45.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN VIROZELE COXSACKIE

Tabloul clinic al infecțiilor cu virus Coxsackie este foarte diferit și diagnosticul clinic fiind dificil, cel de laborator este indispensabil.

Se prelevă și se examinează secreții faringiene, materii fecale, lichid cefalorahidian, conținutul erupțiilor.

Virusoscopic depistăm incluziuni intracelulare situate în nucleu și citoplasmă.

Se izolează în culturi de celule din rinichi de maimuță sau de origine umană virusurile Coxsackie B și unele serovaruri de virus Coxsackie A, însă serovarurile A1, A5, A6, A19, A22 nu se multiplică în culturi de celule. Putem izola aceste serovaruri prin injectare la șoricei sugari pe care îi menținem sub observație până la 14 zile.

Identificarea virusurilor Coxsackie se efectuează prin RN, inițial cu seruri polivalente, apoi cu seruri monospecifice, pe culturi de celule sau pe șoricei sugari.

Unele serovaruri le putem identifica în RIHA cu eritrocite de găină (A7) sau eritrocite umane (A20, A21, A24, B1, B3, B5, B6).

RFC se folosește mai rar.

Pentru *serodiagnostic* se examinează seruri perechi, primul obținut până la 4—5 zile de boală, al doilea la 14 zile. Se recurge la RN cu tulpini de referință pe culturi de celule sau șoricei sugari. Mai puțin sensibile sunt RIHA și RID.

Preparate biologice standardizate pentru diagnostic, profilaxie și tratament nu sunt elaborate.

45.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A VIROZELOR ECHO

Se prelevă și se examinează: spălătura nazofaringiană, sânge, materii fecale, lichid cefalorahidian.

Virusoscozia depistează incluzii intracelulare situate în nucleu și citoplasmă.

Se izolează virusul în culturi de celule. Nu se cultivă pe alte gazde de laborator. Toate serovarurile de virus ECHO produc efect citopatic. Replicarea poate fi urmărită și prin proba culorii.

Identificarea se face prin RN pe culturi de celule, iar pentru unele serovaruri se aplică RIHA cu eritrocite de om grup 0. Este recomandată și imunofluorescența indirectă, în care scop se folosesc seruri polivalente și monospecifice de serovar.

Examenul serologic al serurilor perechi se efectuează prin RN pe culturi de celule, utilizând tulpini de referință ale virusurilor ECHO. Mai puțin utile sunt RFC și RIHA. Diversitatea serovarurilor face dificilă utilizarea testelor serologice, exceptând izbucnirile epidemice în care avem deja izolată tulpina infectantă de la un pacient.

Semnificația clinică a virusului ECHO izolat din prelevate patologice contaminate se bazează pe următoarele criterii:

- de la bolnavi se izolează virusul mai frecvent decât de la sănătoși, care locuiesc în aceeași localitate;
- virusul realizează concentrații mari în produsul patologic;
- În cursul bolii apar anticorpi față de tulpina infectantă izolată (autoserodiagnostic).

Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament specific nu sunt elaborate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE

46.1. DATE GENERALE

46.1.1. O minidefiniție

Virusurile pe care uzual le numim «ale hepatitei» sunt un grup eterogen, care au în comun numai capacitatea de a leza hepatocitele care le replică. Dar leziuni hepatice pot determina și alte virusuri decât cele «ale hepatitei» (e. g. virusul febrei galbene etc.).

46.1.2. Repere taxonomice

Virusul hepatitei A constituie genul *Hepavirus* al familiei *Picornaviridae*. Până recent se numea chiar *Enterovirus 72*.

Virusul hepatitei B este inclus în familia *Hepadnaviridae*. Virionul sferic, de 42—45 nm diametru, are o anvelopă lipoproteică, în care sunt înfipite glicoproteine virale, numite antigeni HB de suprafață (AgHBs). Nucleocapsida conține un genom ADN dublucatenar și parțial monocatenar și două enzime: o polimerază și proteinchinază. Astfel nucleocapsida este sediul celorlalți doi antigeni importanți ai virusului: AgHBc (c de la engl. core = sămbure; nucleotid, nucleu) și AgHBe (e de la enzima). Virionii sunt sensibili la eter și detergenți. În afară de virionul sferic, complet, numit și particula Dane, în sângele și umorile pacienților apar în concentrații mai mari particule sferice cu diametrul de 22 nm sau filamente cu diametrul de 22 nm constituite numai din AgHBs.

Virusul hepatitei C este provizoriu inclus în familia *Flaviviridae* (vezi partea a treia, capitolul 48). Ca toate flavivirusurile este sensibil la eter, detergenți și pH 3,0.

Virusul hepatitei D este un mic virus ARN nud și defectiv rezistent la eter, detergenți sau pH acid. Infectează numai asociat virusului hepatitei B. Încă nu este clasificat.

Virusul hepatitei E aparține probabil familiei *Caliciviridae*, ale cărei virusuri nude au virioni în formă de cupă cu diametrul de 35—40 nm și genom ARN liniar, m.c. Lipsa anvelopei face virusul rezistent la eter și detergenți.

46.1.3. Habitat

Gazda naturală a virusurilor hepatitelor A, B, C și E este omul. Familia *Hepadnaviridae* cuprinde și alte virusuri hepatotrope, care infectează însă numai animalele.

46.1.4. Factori de patogenitate

Funcție de ligand la receptorii celulari au capsomerele virusurilor hepatitelor A și E. La virusurile hepatitelor B și C funcția de ligand o au glicoproteinele virale din anvelopă. Virusul defectiv al hepatitei D infectează numai asociat cu virusul hepatitei B, de la care utilizează AgHBs ca anvelopă cu liganzi pentru fixarea pe hepatocit și penetrare.

Glicoproteinele virale expuse pe membrana hepatocitelor infectate persistent cu virusurile hepatitei B sau C induc reacții de sensibilizare de tip II (citotoxic-citotoxice) implicate în patogenia hepatitei cronice.

46.1.5. Receptivitatea la infecții cu virusurile hepatitei

Receptivitatea la infecții cu virusurile hepatitei este generală.

46.1.6. Hepatitele virale

Virusurile hepatitelor C și E sunt recent descoperite. De aceea mai persistă încă în terminologia medicală denumirea de hepatită non-A, non-B (NANB), utilizată pentru hepatitele care nu puteau fi diagnosticate prin metodele și reactivii pentru hepatita B sau A și care, de fapt, sunt fie o hepatită C, fie una E.

Diferențele etiologice între hepatitele virale se reflectă mai mult în particularitățile epidemiologice și prognostice decât în cele clinice.

Indiferent de agentul etiologic, se întâlnesc forme icterice, anicterice sau subclinice.

■ *Perioada de incubație* este semnificativ mai lungă în hepatitele B și C (40—180 zile) decât în hepatita A (25—30 zile).

■ *Calea de transmitere* este predominant fecal-orală în hepatitele A și E, predominant parenterală în hepatitele B și C (transfuzii, seringi, instrumentar chirurgical și stomatologic contaminat cu sânge, transmitere sexuală a hepatitei B).

■ *Vârsta incidenței maxime*: copilul și adultul tânăr pentru hepatitele A și E; adulții pentru hepatitele B și C (între vârstele de 15—29 ani frecvența crescută a hepatitei B poate fi legată de promiscuitatea sexuală și utilizarea de droguri injectabile).

■ *Complicațiile* sunt rare în hepatitele A și E. Evoluția hepatitei E poate fi gravă la subnutriți și la gravide. Infecția cu virusul hepatitei B se cronicizează însă în proporție de 5—10%, iar cu cel al hepatitei C în proporție de 30—50%, principalele urmări fiind ciroza hepatică și carcinomul hepatocelular.

46.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITEI A

Prelevate examinate: materii fecale, sânge, urină.

Diagnosticul rapid se face prin imunomicroscopie electronică, radioimunotestare și ELISA.

■ Virionii se evidențiază în extractul fecal prin IME, dacă concentrația este mai mare sau egală cu 10^4 . Se amestecă extract 10—20% din materii fecale cu ser imun specific în raport de 9:1. Se incubează la 37°C și se centrifughează 30 minute la 10 000 rpm, după care se decantează supernatantul și se examinează sedimentul la microscopul electronic.

■ Pentru radioimunotestare se adsorb inițial anticorpul pe suprafața unui suport (in eprubete, godeuri), apoi se aplică extractul din materiile fecale pentru cuplarea antigen-anticorp pe suport. Antigenul cuplat se determină prin antiglobuline marcate cu ^{125}I . Preparatul anticorpilor marcați trebuie să conțină 1—2 atomi de iod radioactivi la o moleculă de anticorp.

■ O sensibilitate înaltă o are și ELISA, care de asemenea evidențiază antigenul viral utilizând anticorpi marcați cu peroxidază.

Diagnosticul biochimic (metodă nespecifică) se face paralel. Dozăm în serul sanguin aldolaza, alaninaminotransferaza (ALT), aspartataminotransferaza (AST), bilirubina.

Diagnosticul serologic se bazează pe evidențierea anticorpilor IgM, care apar destul de precoce, și a celor IgG. În acest scop se folosesc ELISA, ARI sau RFC.

Preparate biologice pentru diagnostic și profilaxie specifică:

■ Truse cu imunoglobuline marcate pentru depistarea antigenică rapidă a virusului hepatitei A.

■ Truse cu antigen viral și imunoconjugate pentru depistarea anticorpilor IgM și IgG antiviral hepatită A.

■ Imunoglobulină umană standard, care, administrată în doze de 0,1 ml/kg corp, previne boala la contactii familiali și din colectivități de copii.

46.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITEI B

46.3.1. Diagnosticul direct

46.3.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă și se examinează sângele bolnavului.

46.3.1.2. Diagnosticul rapid

Depistarea AgHBs se face prin RID, contraimmunoelectroforeză (CIE), reacția inversă de hemaglutinare indirectă (RIHAI), ELISA, ARI. RID și CIE sunt cele mai puțin sensibile.

În laboratoarele obișnuite destul de utilă este RIHAI, pentru care, în rezumat: pregătim diluții duble succesive ale materialului de examinat (antigenului) în soluție stabilizatoare (volum egale din soluția 30% zaharoză și ser uman normal). Reacția se efectuează pe plăci din plastic în 3 rânduri de godeuri. Din fiecare diluție a antigenului se pipetează câte o picătură în godeul corespunzător al fiecărui rând. Apoi:

■ în godeurile din primul rând se adaugă câte o picătură din soluția stabilizatoare;

■ în godeurile din rândul doi câte o picătură de ser imun anti-Ag HBs diluat 1:10;

■ în godeurile din rândul trei câte o picătură de ser imun heterolog. Se incubează amestecul 20 minute la temperatura camerei. Se adaugă în toate godeurile câte o picătură din suspensia 1% de eritrocite sensibilizate cu imunoglobuline anti-AgHBs și se agită minuțios.

Citim rezultatele reacției după 30—40 minute. Dacă proba conține AgHBs, hemaglutinarea se observă în rândurile 1 și 3, dar lipsește în rândul 2, unde antigenul a fost neutralizat cu ser omolog.

Antigenul HBs se depistează în serul bolnavului după 1—4 săptămâni de la contagiu

(în perioada de incubație) și cu câteva săptămâni (2—8) înainte de modificările biochimice (creșterea activității aminotransferazelor).

Cantitatea de AgHBs este maximă în perioada de stare a bolii, iar în următoarele 3 luni cantitatea lui scade sau persistă. Depistarea AgHBs după un an de la îmbolnăvire indică o hepatită cronică sau un portaj asimptomatic.

Depistarea în sânge a AgHBe și AgHBc în același timp cu AgHBs denotă o infecție acută cu replicarea activă a virusului. În general, AgHBc rămâne cantonat în hepatocite și apare rar în sânge.

Persistența îndelungată a AgHBe semnează cronicizarea procesului și un potențial infectiv crescut al sângelui și secrețiilor (spermă etc.).

Stadiul de convalescență cu vindecare microbiologică se caracterizează prin dispariția din serul bolnavului a antigenilor Hbc și HBe și apariția anticorpilor față de toți cei trei antigeni virali.

Nu dispunem de posibilități practice pentru izolarea virusului hepatitei B, care poate fi cultivat numai în țesuturi de cimpanzei și în hepatocitele embrionului uman.

46.3.1.3. Teste biochimice

Testele biochimice sunt aceleași ca și în hepatita A. La bolnavii gravi nivelul aspartataminotransferazei este mai înalt ca al alaninaminotransferazei. Apare bilirubina în urină (normal absentă).

46.3.2. Diagnosticul serologic

Determinarea anticorpilor specifici față de antigenii virusului hepatitei B se efectuează prin RID, CIE, ARI, ELISA sau RHA1 cu eritrocite sensibilizate cu AgHBs.

Anticorpii anti-HBs pot fi depistați după 1—3 luni de la dispariția antigenului HBs și persistă timp de 3—4 ani.

Anticorpii anti-HBc se depistează în sânge după 3—5 săptămâni de la apariția antigenului HBs. Acești anticorpi au importanță diagnostică deosebită: servesc ca marker serologic pe parcursul primelor 1—2 luni de boală.

Anticorpii anti-HBe apar după 1—3 săptămâni de la debutul bolii și persistă câteva luni la titruri joase.

Diagnosticul hepatitei B se bazează pe depistarea antigenilor HBs și HBe și a anticorpilor anti-HBc și anti-HBe din clasele IgM și IgG. Prezența în ser a anticorpilor anti-HBc din clasa IgM indică fără echivoc hepatita B acută. Titruri înalte și stabile de anticorpi anti-HBc demonstrează prezența unei infecții cronice.

46.3.3. Preparate biologice pentru diagnosticul și profilaxia specifică a hepatitei B

■ Truse ELISA pentru depistarea și identificarea antigenilor sau anticorpilor față de antigenii virusului hepatitei B.

■ Vaccin cu AgHBs purificat din plasma purtătorilor sau, mai eficient, obținut prin inginerie genetică (clonarea genei virale care codifică AgHBs în drojzii de bere). Așa este vaccinul belgian Engerix. Calendarul vaccinării prevede în Moldova vaccinarea nou-născuților în primele 24 ore, cu revaccinări la 1 lună și 6 luni.

46.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITELOR NON-A, NON-B

Diagnosticul este dificil. Se iau în considerație datele clinicoepidemiologice. În cazul hepatitei NANB parenterală, prin teste specifice ca ARI, ELISA, trebuie excluse hepatitele A și B. În prezent se comercializează deja truse ELISA pentru depistarea antigenului HCV sau a anticorpilor anti-HCV.

Pentru hepatita NANB enterală nu este elaborat nici un test serologic. Putem depista în materiile fecale ale bolnavilor virionii prin imunoscopie electronică, folosind seruri specifice obținute de la convalescenți.

Hepatita D o diagnosticăm prin depistarea antigenului viral delta, AgHD, în ser prin ARI sau ELISA ori în ficat prin metode imunohistochimice. De asemenea putem depista prin ELISA sau ARI anticorpii specifici din clasa IgM ori IgG. Anticorpii anti-HDV îi căutăm numai în seruri AgHBs pozitive.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE ROTAVIRUSURI

47.1. DATE GENERALE

47.1.1. O minidefiniție

Rotavirusurile (lat. *rota* = roată; după aspectul electronmicroscopic de roți mici cu bucsă masivă, spițe scurte și obadă fină) au virionul cu dublă capsidă, dar lipsit de anvelopă, și un diametru de 65—75 nm. Genomul este ARN d.c., liniar, cu 10—12 segmente. Sunt rezistente la eter, detergenți și pH 3,0.

47.1.2. Repere taxonomice

Genul *Rotavirus* face parte din familia *Reoviridae* împreună cu genurile *Reovirus* și *Orbivirus*.

Au un antigen specific de grup localizat în capsida internă și antigeni specifici de tip localizați în capsida externă. Există cel puțin 6 serovaruri ale rotavirusurilor umane.

47.1.3. Habitat

Rotavirusurile grup A infectează omul. Alte serogrupuri infectează, cu tropism de specie, animalele (rotavirusuri simiene, bovine, porcine etc.).

47.1.4. Factori de patogenitate

Liganzii din capsida externă fixează rotavirusurile pe enterocitele din vârful vililor intestinului subțire, în care sunt replicate. Lezarea acestor celule producătoare de dizaharidaze deprimă absorbția lactozei, care, fermentată de microflora intestinală, generează acumulare de produși acizi, osmotici activi, care, prin aflux hidroelectrolitic, determină diaree.

47.1.5. Receptivitatea la infecția cu rotavirus

Receptivitatea la infecția cu rotavirus este mai mare în primii trei ani de viață. Adulții sunt rar infectați.

47.1.6. Gastroenterita rotavirală

Gastroenterita rotavirală apare după o incubajie de 1—3 zile. Debutul este acut, cu diaree, vomă, grețuri și dureri abdominale. Scaunul apare abundent, apos, spumos, de culoare galbenă, uneori alburie. Caracteristic este garguimentul intestinal.

47.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A GASTROENTERITEI VIRALE

Diagnosticul direct. *Prelevatele patologice.* Se recoltează aseptice materii fecale și se transportă la laborator în container cu gheață carbonică.

Se pregătește o suspensie 10—20% de materii fecale în soluție Hanks, care se centrifughează 20 minute la 10 000 rpm. Se decantează, se transportează supernatantul clarificat cu antibiotice (penicilină 1000 UI/ml și streptomycină 500 μg/ml) și se menține la frigider 10—12 ore.

Diagnosticul rapid. Depistăm virionii în materiile fecale ale bolnavilor prin imunomicroscopie electronică, ARI sau ELISA.

În primele zile de boală, când concentrația virusului în materii fecale ajunge la 10^{6-8} virioni/g, poate fi depistat virusul și prin *microscopie electronică simplă* cu mărire de 50 000X. Pentru aceasta se colorează negativ o picătură din supernatant cu acid fosfotungstic 2% (pH 6,5), se pregătește preparatul și se examinează.

Imunomicroscopia electronică. Se amestecă 0,1 ml ser imun antirotavirus în diluție 1:5 cu 0,4 ml din suspensia de fecale. Se incubează amestecul o oră la temperatura camerei și 12 ore la frigider, apoi se centrifugează 90 minute la 15000 rpm. La sediment se adaugă câteva picături de apă distilată, se colorează negativ cu acid fosfotungstic 2% și se examinează. La microscopul electronic depistăm agregate de virioni tipici.

Pentru *colorația imunofluorescentă* se pregătește o suspensie 2% de materii fecale, se centrifughează și se filtrează supernatantul prin filtru cu diametrul porilor de 1,2 μm. Se amestecă apoi 0,2 ml filtrat cu 0,2 ml ser imun. Se incubează amestecul o oră la 37°C, după care se centrifughează o oră la 12 000 rpm. Se resuspendează sedimentul în 0,2 ml tampon fosfat și se adaugă 0,2 ml de imunoglobuline fluorescente. După 10 minute de incubajie, se centrifughează amestecul 10 minute la 2 000 rpm, se decantează și se resuspendează sedimentul în tampon fosfat, apoi se examinează între lamă și lamelă la microscopul luminescent cu obiectivul de imersie.

Metode mai sensibile sunt: ELISA, ARI sau RIHA.

Rotavirusurile umane nu pot fi cultivate în laborator.

Diagnosticul serologic. Se urmărește creșterea titrului anticorpilor specifici în serurile pereche recoltate în primele 3—4 zile de boală și după 2 săptămâni.

Se determină anticorpii prin imunomicroscopie electronică, utilizând antigen preparat din fecale cu o concentrație mare de rotavirus. Putem recurge și la RFC, RIHA, RIF, ARI sau ELISA.

Preparate biologice pentru diagnosticul gastroenteritelor rotavirale:

- Seruri imune antirotavirus pentru IME, RIF.
- Truse pentru depistarea rotavirusurilor prin ELISA, ARI, RIHA.
- Antigeni rotavirali pentru RFC, RIHA, RIF, ARI sau ELISA.

Preparate pentru profilaxia și terapia specifică nu sunt elaborate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENCEFALITEI TRANSMISE DE ACARIENI (CĂPUȘE)

Encefalita transmisă de acarieni este cauzată de unele flavivirusuri.

Flavivirusurile au virionul sferic de 40—70 nm diametru cu anvelopă, nucleocapsidă icosaedrică și genom ARN m.c. «+». Sunt sensibile la eter, detergenți sau pH acid. Glicoproteinele nvelopei sunt purtătoare ale caracterelor antigenice și activității hemaglutinante.

În familia *Flaviviridae* sunt delimitate patru subgrupe antigenice:

- virusurile encefalitelor transmise de țânțari;
- virusurile febrei Denga;
- virusul febrei galbene;
- virusurile encefalitelor transmise prin căpușe, singurele asupra cărora insistăm, pentru că circulă în Europa și Rusia.

Tulpinile de virus, izolate de la bolnavi cu encefalită și de la căpușele vector din diverse țări diferă antigenic neesențial și mai mult cantitativ decât calitativ. După caracterele antigenice, aceste virusuri sunt înrudite cu alte virusuri din familie (virusul encefalitei scoțiene, al febrei hemoragice de Omsk ș.a.).

Gazde naturale ale acestor virusuri sunt diferite mici mamifere sălbatice (rozătoare etc.). Vectori sunt căpușele, în organismul cărora virusurile encefalitogene se pot transmite, transovarian, de la o generație la alta. Omul devine gazdă accidentală când este înțepat de căpușa vector sau când consumă lapte nefiert de la vaci și capre pășunate în focarele naturale de infecție.

Receptivitatea la infecția cu virusurile encefalitei acariene este generală.

Encefalita transmisă de acarieni este o viroză acută, caracterizată prin afectarea substanței cenușii a encefalului și măduvei spinării cu dezvoltare de pareze și paralizii flasce. Boala este dominată de trei sindroame: infecțios general, meningeal și afectarea focală a sistemului nervos.

48.1. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN ENCEFALITA TRANSMISĂ DE ACARIENI

48.1.1. Diagnosticul direct

48.1.1.1. Prelevatele patologice

Se examinează sângele, lichidul cefalorahidian, care trebuie recoltate în primele zile

de boală; probe necroptice: fragmente din creier, ficat, splină, rinichi, ganglioni limfatici, căpuşe.

Se recomandă ca materialul recoltat pentru examenul virusologic să fie examinat în aceeaşi zi. Conservarea probelor este posibilă 1—2 zile la frigider (+4°C), iar pentru un timp mai îndelungat la —80°C. Fragmente din organe se pot conserva în soluţie 50% de glicerină la +4°C.

Probele presupus contaminate cu floră bacteriană se tratează cu amestec de antibiotice (200 UI penicilină/ml şi 100 µg streptomicină/ml).

48.1.1.2. Metode rapide

Putem depista antigenul viral în probe de la bolnav prin RIF sau ELISA.

48.1.1.3 Izolarea virusului

Izolarea virusului se efectuează :

- Prin infectarea intracraniană a şoarecilor albi nou-născuţi. Animalele infectate trebuie examinate cel puţin de două ori pe zi timp de 2—3 săptămâni. Simptoamele bolii la şoareci: refuzul alimentaţiei, modificarea culorii, oprirea creşterii, hiperreactivitate, poziţie în decubit lateral.

- Prin inocularea probelor în culturi de celule: fibroblaşti de găină, celule din rinichi de embrion porc, linii continue.

- Pe ouă embrionate prin injectare în embrion, în sacul vitelin sau pe MCA.

În funcţie de sistemul biologic folosit, se urmăreşte izolarea virusului prin ECP, moartea şoarecilor, a embrionului şi prin RHA cu eritrocite de găscă.

Identificarea se face prin RN, RFC, RIHA.

48.1.2. Diagnosticul serologic

Se prelevă seruri pereche şi se urmăreşte, prin RN, RFC sau RIHA, creşterea de cel puţin 4 ori a titrului anticorpilor în serul tardiv.

48.1.3. Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie şi tratament

- Ser imun specific de tip pentru identificarea virusului.

- Antigenul virusului encefalitei transmise de acarieni, preparat din creierul şoarecilor infectaţi, pentru RFC.

- Vaccin inactivat pentru profilaxie în focare naturale.

- Imunoglobulină hiperimună antiencefalitică utilizată pentru profilaxia şi tratamentul encefalitei acariene în doză de 6—9 ml administraţi intramuscular în primele zile de boală.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RUBEOLEI

49.1. DATE GENERALE

Virusul rubeolic este un togavirus cu virion sferic de 50—70 nm diametru. Genomul ARN m.c. «+» este cuprins într-o nucleocapsidă icosaedrică. Anvelopa îi conferă activitate hemaglutinantă asupra unor eritrocite aviare (de porumbel, găscă). Este sensibil la eter și detergenți.

Virusul rubeolic este unica specie a genului *Rubivirus* din familia *Togaviridae*. Are un singur tip antigenic.

Omul este singura gazdă. Spre deosebire de alte togavirusuri nu se transmite prin artropode, ci numai pe cale respiratorie sau transplacentar.

Cel mai receptiv la rubeolă este embrionul (vezi mai jos). După naștere infecția cu virusul rubeolic evoluează benign sau inaparent.

Rubeola este o boală infecțioasă virală caracterizată prin exantem micromacular, limfadenopatie generalizată, manifestări catarale respiratorii ușoare și afectarea embrionului la gravide. Se îmbolnăvesc mai frecvent copiii, dar se constată și la adulți. La femeile gravide virusul infectează, transplacentar, embrionul sau fătul, cauzând moartea acestora sau diverse malformații congenitale.

49.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A RUBEOLEI

Prelevate patologice. Se examinează exsudatul nazofaringian și sângele în perioada preeruptivă (cca o săptămână); sângele, urina, materiile fecale după apariția erupției.

De la avortoni se examinează probe necroptice din diferite organe, iar de la copiii suspecți de sindrom rubeolic congenital urina și materiile fecale, prin care virusul se elimină timp îndelungat.

Diagnosticul rapid. Antigenul viral rubeolic poate fi identificat prin colorare imuno-fluorescentă a frotiurilor din exsudatul nazofaringian.

Izolarea virusului se face prin infectarea liniilor celulare Vero, RK13 sau a celulelor amniotice umane, în care virusul cultivă cu efect citopatic: apariția de celule gigante multinucleate și de incluziuni citoplasmice acidofile. În alte culturi de celule, ca cele renale de maimuță verde, virusul este replicat fără efect citopatic, interferând efectul citopatic rapid al unor picornavirusuri. Astfel dacă la testarea culturii de celule cu virus ECHO 11 efectul citopatic lipsește, virusul rubeolic este prezent în proba inoculată și invers, dacă efectul citopatic apare, virusul rubeolic este absent.

Testele serologice sunt mai accesibile și confirmă diagnosticul clinic. Putem urmări diferențiat anticorpii din clasele IgM și IgG.

Anticorpii IgM apar precoce și persistă până la 10 săptămâni după infecție, de aceea determinarea lor indică infecția recentă, chiar pe probă unică de ser. Ei pot fi depistați prin imunofluorescență indirectă, ELISA sau ARI utilizând imunoconjugate anti-IgM.

Creșterea titrului de anticorpi IgG se determină examinând seruri pereche. Primul ser se recoltează după 1—3 zile de la apariția erupției, iar al doilea după 1—2 săptămâni.

Pentru testare este utilă și RIHA cu eritrocite de porumbel.

Preparate biologice pentru diagnosticul și profilaxia rubeolei:

- Antigen rubeolic.
- Ser imun antirubeolic pentru RIHA.
- Imunoconjugate marcate diferențiat pentru RIF indirectă, ELISA sau ARI.
- Vaccin viu atenuat administrat parenteral, în doză unică, la vârsta de 12 luni pentru profilaxia rubeolei.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RABIEI

50.1. DATE GENERALE

50.1.1. O minidefiniție

Virusul rabic are virioni în formă de glonj cu dimensiuni de 180—200 nm/70—80 nm cuprinși într-o anvelopă lipoproteică pe suprafața căreia proiemină spiculi de cca 10 nm lungime. Nucleocapsida cu simetrie helicală conține genomul ARN m. c. liniar «—» și o ARN-polimerază. Eterul, dezoxicolatul de sodiu, radiațiile ultraviolete, căldura (5—10 minute la 60°C), tripsina, cloramina, lizolul îl inactivează rapid.

50.1.2. Repere taxonomice

Virusul rabic este specia tip a genului *Lyssavirus* din familia *Rhabdoviridae* (gr. *rhabdos* = baston; virus cu formă alungită, cilindrică).

50.1.3. Habitat

Spectrul gazdelor naturale ale virusului rabic este foarte larg; infectează mortal toate mamiferele exceptând liliicii, care fac infecția inaparent cu localizarea virusului în glandele salivare, de unde este eliminat cu saliva.

50.1.4. Factori de patogenitate

Virusul are tropism pentru variate țesuturi din organismul animalelor cu sânge cald, cel mai important fiind tropismul pentru sistemul nervos central și glandele salivare. Replicat în celulele musculare și ale țesutului conectiv de la poarta de intrare (uzual mușcătură, zgârietură contaminată cu saliva unui animal infectat) se propagă prin celulele Schwann ale endonervului spre sistemul nervos central, unde este replicat masiv și de unde se propagă centrifug, tot pe cale nervoasă, spre glandele salivare, cornee ș. a.

Virusul proaspăt izolat de la animalele transmitătoare ale infecției a fost numit virusul rabic «de stradă», pentru că mai frecvent boala se transmite prin mușcătura câinilor vagabonzi.

După mai multe pasaje intracerebrale la iepure s-a obținut virusul rabic «fix», care este replicat rapid cauzând infecția experimentală după o perioadă scurtă de incubație (în medie 5 zile). Acest virus nu este însă patogen pentru câini și om și a fost folosit pentru producerea vaccinului antirabic.

Caracterele antigenice ale acestor varietăți de virus sunt identice.

50.1.5. Receptivitatea la rabie

Receptivitatea la rabie este generală.

50.1.6. Rabia

Rabia este o boală infecțioasă acută, transmisă de la animale prin mușcătură și caracterizată prin afectarea sistemului nervos central cu dezvoltarea unei encefalomielite letale. Boala debutează după o incubajie de 2—16 săptămâni (în 2—3 săptămâni) și evoluează în trei stadii: depresiv (prodromal), de excitație și paralytic.

50.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A RABIEI

Prelevate patologice. Se examinează: saliva bolnavilor, creierul și glandele salivare submaxilare ale animalelor și persoanelor decedate, care se recoltează cu precauție (bucăți din diferite sectoare) și se introduc într-un recipient steril cu glicerină pentru transportul la laborator în container cu gheață.

Diagnosticul rapid se bazează pe depistarea corpusculilor Babeș-Negri în țesutul cerebral prin RIF. Putem depista acești corpusculi și prin colorarea amprentelor de creier prin metode speciale (corpusculii apar roșu-rubinii, iar citoplasma și nucleul în albastru). Pentru depistarea antigenului viral pe amprente și în secțiuni histologice, se recurge la RIF, directă sau indirectă, cu imunoglobuline antirabice comerciale de origine ecvină.

Izolarea virusului rabic din prelevatele patologice se face prin injectare intracerebrală la șoareci albi adulți. După infectare șoarecii fac paralizii și mor. Pe amprente din creierul șoarecilor sacrificați sau decedați depistăm corpusculii Babeș-Negri și antigenul specific prin RIF.

Examenul serologic se efectuează pentru determinarea imunității postvaccinale. Anticorpii față de virusul rabic pot fi evidențiați prin RN, RFC, ARI sau ELISA.

Preparate biologice pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul rabiei:

- Imunoconjugate fluorescente pentru identificarea antigenică a virusului rabic.
- Imunoglobulină antirabică obținută de la cai pentru tratament și profilaxie.
- Vaccin inactivat antirabic pentru profilaxie.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU HERPESVIRUSURI

51.1. DATE GENERALE

51.1.1. O minidefiniție

Herpesvirusurile au virionii sferici, cu diametrul de 150—200 nm, înveliți într-o anvelopă lipoproteică derivată din membrana nucleară a celulei gazdă. Nucleocapsida, cu simetrie icosaedrică, cuprinde un genom ADN d. c.

51.1.2. Repere taxonomice și habitat

Herpesvirusurile constituie familia *Herpesviridae* cu trei subfamilii:

1. Subfamilia *Alphaherpesvirinae*, care cuprinde două genuri:

■ *Simplexherpesvirus*, din care reținem *virusurile herpetice umane 1 și 2*, precum și *virusurile herpetice ale cercopitecilor*.

■ *Varicellavirus*, din care ne interesează specia tip *virusul herpetic uman 3* (virusul varicella-zoster). Alte specii infectează animale.

2. Subfamilia *Betaherpesvirinae* cu două genuri *Citomegalovirus uman* (*virusul herpetic uman 5*) și *Citomegalovirus murin*.

3. Subfamilia *Gammaherpesvirinae* are trei genuri, dintre care reținem numai principalul gen care infectează omul: *Lymphocryptovirus*, cu specia tip *virusul herpetic uman 4* (virusul Epstein-Barr), agentul etiologic al mononucleozei infecțioase.

51.1.3. Factori de patogenitate

Factorii de patogenitate ai herpesvirusurilor sunt insuficient definiți. Caracteristic, infecția primară cu un herpesvirus este urmată de infecția persistentă (latentă), care se poate reactiva.

51.1.4. Receptivitatea la infecțiile cu herpesvirusuri

Receptivitatea cu herpesvirusuri este generală. Reactivarea infecțiilor persistente apare după deprimarea rezistenței gazdei prin diferiți factori de stres, imunodepresie sau imunosupresie.

51.1.5. Boli cauzate de herpesvirusuri

Herpesul simplex este o boală infecțioasă recidivantă manifestată prin erupții veziculare pe piele și membranele mucoase, precum și prin afectarea gravă a sistemului nervos și organelor interne. În mod natural, infecția determinată de virusul herpetic uman

I are poartă de intrare orală, iar cea determinată de virusul herpetic uman 2, genitală. Formele clinice ale herpesului simplex pot fi: infecția herpetică a pielii — herpes cutanat (localizată sau extinsă); stomatita herpetică; herpesul genital; cheratita și cheratoconjunctivita herpetică; encefalita și meningoencefalita herpetică; herpesul visceral (hepatite, pneumonii); herpesul generalizat al nou-născuților (herpes neonatal).

Varicela este o boală infecțioasă acută cauzată de virusul herpetic uman 3 (virusul varicella-zoster), predominantă la copii, caracterizată printr-o evoluție benignă, intoxicație moderată, febră și erupție maculoveziculară.

Herpesul zoster (eczema circulară) este o viroză caracterizată prin febră, intoxicație, inflamația ganglionilor nervoși spinali cu apariția unei erupții veziculare pe dermatomul nervilor senzitivi implicați în proces. Boala este cauzată de reactivarea infecției persistente cu virusul herpetic uman 3. Formele clinice ale infecției sunt: gangliocutanată, auriculară și oftalmică, gangrenoasă (necrotică), meningoencefalitică, diseminată.

51.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HERPESULUI SIMPLEX

51.2.1. Diagnosticul direct

51.2.1.1. Prelevate patologice

• Se examinează, în funcție de manifestările clinice ale bolii, conținutul veziculelor, cruste, salivă, lichid cefalorahidian, frotiuri din exsudatul veziculelor de pe mucoasa cavității bucale sau organelor genitale; sângele în infecțiile generalizate; probe de creier și măduva spinării în cazurile letale.

51.2.1.2. Diagnosticul rapid

Se efectuează frotiuri sau amprente din veziculele herpetice, se colorează Giemsa și se examinează la microscopul optic. Prezența celulelor gigante polinucleate, cu incluziuni eozinofile intranucleare indică infecția herpetică.

Virionii cu morfologie tipică, precum și antigenul specific viral pot fi depistați în microscopia electronică, respectiv prin RIF sau ELISA. În cazurile letale se caută antigenul specific pe amprente și secțiuni din creier și măduva spinării.

51.2.1.3. Izolarea virusului

Cu materialul de examinat se infectează embrionii de găină de 12 zile pe MCA și se incubează la 37°C. Se urmărește după 48 ore apariția pe MCA a unor *pock*-uri tipice, dense. Pe amprente din aceste leziuni, la microscopul optic, se observă celule gigante cu incluziuni eozinofile intranucleare.

Pentru izolarea virusului în culturi de celule mai utile sunt culturile primare din rinichi de iepure, embrion uman, celulele HeLa. După incubare de 4—7 zile în culturile de celule infectate apar celule gigante polinucleate, celule rotunjite și conglomerate, în care găsim incluziuni intranucleare.

Virusul herpes simplex poate fi izolat și în organismul șoricelilor sugari de 2—4 zile infectați intracerebral sau intraperitoneal. Iepurii și cobaii se infectează intracerebral sau pe corneea scarificată. Prezența virusului herpetic în materialul inoculat determină la șoricea, după 3—7 zile, paralizii și moarte, iar în celulele corneei infectate depistăm prin RIF incluziuni intranucleare și antigenul viral specific.

Identificarea virusurilor izolate se efectuează prin RN pe șoricea, culturi de celule sau embrioni de găină cu seruri specifice standardizate.

51.2.2. Diagnosticul serologic

Se urmărește creșterea de cel puțin 4 ori a titrului de anticorpi prin examinarea serurilor pereche în RN și RFC. Antigenul pentru aceste reacții este preparat din MCA sau din creier de șoricea sugari infectați cu virusul herpes simplex.

51.2.3. Preparate biologice și medicamente pentru diagnostic, profilaxie și terapie

- seruri imune standardizate pentru identificarea virusului herpes simplex prin RN;
- imunoglobuline hiperimune umane antiherpetice pentru profilaxie;
- interferon pentru profilaxie;
- acyclovir pentru profilaxie și terapie.

51.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A VARICELEI

Se prelevă și se examinează: conținutul erupțiilor cutanate (raclat din papule, lichid vezicular, cruste), exsudat nazofaringian, sânge. *Post mortem* se examinează fragmente de pulmon și ficat.

Diagnosticul rapid. Din lichidul vezicular se efectuează preparate pe care le colorăm Giemsa. La microscopul optic putem depista astfel celule gigante multinucleate cu incluziuni eozinofile intranucleare (corpusculi Aragan). Pentru depistarea antigenului specific se folosește RIF, ELISA, RFC, iar virionii se depistează prin imunomicroscopie electronică.

Izolarea virusului. Mai sensibile sunt celulele embrionului uman. Pot fi utilizate și culturi de celule din rinichi de maimuță sau iepure. Virusul varicelei produce efect citopatic caracterizat prin apariția de celule rotunjite și de celule gigante multinucleate și incluziuni intranucleare eozinofile. Identificarea virusului se efectuează prin RN cu seruri de la convalescenți cu un titru considerabil de anticorpi; este recomandată și imunofluorescența.

Serodiagnosticul este mai accesibil și permite diferențierea varicelei de alte boli eruptive prin creșterea semnificativă a titrului anticorpilor. Utilizăm RFC cu antigenul specific din extractul culturilor celulare infectate triplu congelate și decongelate.

Profilactic, copiilor debili contactați ai bolnavilor (e. g. în colectivități de copii) li se administrează imunoglobulină umană hiperimună antivariicelă (3 ml intramuscular).

51.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HERPESULUI ZOSTER

Se prelevă și se examinează conținutul veziculelor, raclatul din papule.

Diagnosticul rapid. Din lichidul vezicular se efectuează frotiuri pe care le colorăm Giemsa. La microscopul optic se observă celule gigante polinucleate cu incluziuni eozinofile intranucleare. Virusul poate fi evidențiat prin imunomicroscopie electronică. Antigenul specific îl putem depista prin RIF, ELISA sau RFC în conținutul veziculelor și pustulelor sau în sedimentul suspensiei de cruste.

Izolarea virusului se face în culturi de celule din embrion uman sau de maimuță. Efectul citopatic este caracterizat prin prezența celulelor rotunde și a celulelor gigante polinucleate. În celulele infectate se depistează incluziuni eozinofile intranucleare.

Virusul izolat se identifică prin RN și RIF, folosind seruri obținute de la convalescenți.

Pentru *diagnosticul serologic* sunt recomandate RN, RFC sau ELISA. Preparate biologice pentru profilaxie și tratament specific nu sunt elaborate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ADENOVIROZELOR

52.1. DATE GENERALE

52.1.1. O minidefiniție

Adenovirusurile sunt virusuri nede cu diametrul mediu de 70—90 nm. Nucleocapsida cu simetrie icosaedrică are la fiecare din cele 12 vârfuri o prelungire fibrilară cu acțiune hemaglutinantă. Genomul este ADN d. c. liniar. Absența anvelopei le face rezistente la eter și detergenți.

52.1.2. Reper taxonomice și habitat

Adenovirusurile umane și cele ale mamiferelor constituie genul *Mastadenovirus* al familiei *Adenoviridae*.

Din structura antigenică a adenovirusurilor reținem:

- Antigenul *alfa*, prezent în capsomerele fețelor icosaedricului (hexoni), care poate fi depistat prin RFC și este specific grupului adenovirusurilor umane.
- Antigenul *beta*, prezent numai în capsomerele din vârful icosaedricului (baza pentonei), cu activitate toxică responsabilă de efectul citopatic al adenovirusurilor.
- Antigenul *gamma*, prezent în fibra pentonei, cu efect hemaglutinant și specificitate de tip.

Adenovirusurile umane au 41 serovaruri reunite în șase serogrupe (A—F). Capacitatea hemaglutinantă variază cu serogrupele și serovarurile astfel:

- Hemaglutinarea de tip I include serogrupul B cu serovarurile 3; 7; 11; 14; 16; 34; 35 și este completă numai cu eritrocitele maimuței *Macacuscus rhesus*.
- Hemaglutinarea de tip II include serogrupul D cu serovarurile 8—10; 13; 15; 17; 19; 20—30; 32; 33; 36—39 și este completă numai cu eritrocitele de șobolan.
- Hemaglutinarea de tip III include serogrupul C cu serovarurile 1; 2; 5; 6, serogrupul E cu serovarul 4, serogrupul F cu serovarurile 40; 41 și este parțială cu eritrocitele de șobolan.
- Hemaglutinarea de tip IV include serogrupul A cu serovarurile 12; 18; 31 și este evidentă cu eritrocitele de șobolan numai în prezența serului heterotipic. Practic, în activitatea curentă de laborator aceste serovaruri nu sunt hemaglutinante.

52.1.3. Factori de patogenitate

Fibrele pentonei adenovirale se fixează pe receptori celulari și inițiază infecția. Fiecare celulă are cca 100 000 receptori fibră/celulă. Există un anumit tropism al serogrupelor de adenovirusuri umane pentru diferite mucoase: e. g. serogrupul B pentru mucoasele respiratorii, D pentru conjunctivă etc.

52.1.4. Receptivitatea la adenoviroze

Receptivitatea la infecțiile cu adenovirus este generală și mai mare la copii. Mai frecvente în patologia umană sunt serovarurile 1—8; 14—21; 34; 35; 40; 41.

52.1.5. Adenovirozele

Adenovirozele sunt boli infecțioase acute caracterizate prin afectarea preponderentă a căilor respiratorii, conjunctivei, intestinului, vezicii urinare, uretrei sau cervixului uterin. Evoluază cu următoarele forme clinice: rinofaringite, febră faringoconjunctivală, pneumonie interstițială, conjunctivite și cheratoconjunctivite; mai rar: diaree (serovarurile 40; 41), cistită hemoragică la copii (serovarurile 11; 21), uretrite și cervicite (serovarurile 8; 19; 37).

52.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A ADENOVIROZELOR

52.2.1. Diagnosticul direct

52.2.1.1. Prelevate patologice

În perioada acută a bolii se recoltează exsudatul nazofaringian, conjunctival, sângele. Materiile fecale le putem examina timp de 10 zile după debutul bolii. De la cadavru se recoltează segmente din trahee, bronhii, plămâni, intestin, ganglioni limfatici regionali, pe care le expedim și le conservăm congelate în gheață carbonică.

52.2.1.2. Diagnosticul rapid

În celulele epiteliale ale mucoasei nazofaringiene se pune în evidență antigenul specific prin RIF, ARI sau ELISA.

52.2.1.3. Izolarea virusului

Se face prin infectarea culturilor primare din rinichii embrionului uman sau liniile diploide de celule obținute din embrionul uman, care sunt sensibile la toate serovarurile de adenovirus.

NOTĂ. În culturi de celule nu se recomandă de introdus ser bovin, care inhibă replicarea adenovirusurilor. Se urmărește 10—14 zile apariția efectului citopatic: celulele devin voluminoase, uneori granulare, cu incluziuni intranucleare și se aglomerează în clorchini.

Virusul izolat se identifică prin RFC sau prin RN cu seruri imune de tip.

Inițial, RN se face cu amestec de seruri specifice de tip, apoi cu fiecare din serurile amestecului cu care a reacționat tulpina izolată.

Serovarurile hemaglutinante de adenovirus pot fi identificate prin RIHA cu eritrocite de șobolan sau *Macaccus rhesus* (vezi mai sus).

NOTĂ. Inhibitorii nespecifici din serurile imune trebuie în prealabil adsorbiți prin tratare cu caolin sau cu o suspensie de eritrocite. Incubarea reacției cu eritrocite de maimuță se face la 37°C, cu cele de șobolan la temperatura camerei.

52.2.2. Diagnosticul serologic

Se examinează seruri pereche în RFC cu antigen adenoviral. Semnificație clinică are creșterea de 4 ori a titrului de anticorpi în serul al doilea.

52.2.3. Preparate biologice utilizate în diagnostic, profilaxie și tratament

■ Seruri antiadenovirus specifice de tip pentru identificarea, prin RN și RIHA, a tulpinilor izolate.

■ Antigeni adenovirali pentru serodiagnostic.

■ Imunoglobulină umană standard pentru profilaxia infecției la copiii debili.

■ Interferon.

■ Di- și trivaccinuri inactivate.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VARIOLEI

53.1. DATE GENERALE

Virusul variolei este unul din cele mai mari virusuri. Virionul are aspect de cărămidă cu colțurile rotunjite și dimensiuni de 300—450 nm lungime/170—250 nm lățime. Un înveliș lipoproteic extern include, flancat de doi corpi laterali și înconjurat de o membrană internă, miezul, care conține genomul ADN d. c. și enzime implicate în replicare. Funcția corpiilor laterali rămâne necunoscută.

Virusul variolei umane este o specie a genului *Orthopoxvirus* din familia *Poxviridae* (engl. *pock* = pustulă; virusuri care provoacă pustule). Are două variante: una determină îmbolnăviri grave, *variola major*, cu mortalitate de până la 40%, iar cealaltă mai benignă, *variola minor* sau alastrim, cu mortalitate sub 1%.

În afara virusului variolei umane (în prezent eradicat), genul *Orthopoxvirus* mai cuprinde virusul variolei maimuțelor, care poate infecta accidental omul; virusul vaccinal, care infectează vacile și imunizează încrucișat cu virusul variolei. Virusul vaccinal este folosit ca vaccin antivariolic viu atenuat, pentru că determină la omul normal o infecție minoră, localizată.

Receptivitatea omului la variolă era generalizată și maximă.

Variola este o boală infecțioasă extrem de contagioasă, caracterizată prin toxemie intensă și o erupție veziculopustuloasă urmată de cicatrice. *Variola major* are mai multe forme clinice:

- Forma confluentă, caracterizată prin confluența elementelor eruptive cu formarea unor vezicule umplute cu puroi.
- Forma hemoragică, întâlnită în două variante: hemoragică pustuloasă și purpura variolică, formă severă, cu mortalitate de 100%.
- Forma varioloidă, o formă ușoară la vaccinați.

53.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A VARIOLEI

53.2.1. Diagnosticul direct

53.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează: conținutul veziculelor, pustulelor, cruste de pe piele și membranele mucoase, exsudat nazofaringian, sânge. În cazuri letale se prelevă probe necroptice din tegumente lezate, plămân, splină.

53.2.1.2. Diagnosticul rapid

Antigenul viral se evidențiază prin RIF, RIHAI, RID sau ELISA. Pe amprente din vezicule și pustule, colorate prin impregnație argentică după Morozov, putem observa incluziuni paranucleare Guarnieri, 1—2 sau mai multe per celulă, cu diferite forme și dimensiuni.

Microscopia electronică a prelevatelor patologice pune în evidență virioni cu morfologie tipică.

În RIHAI antigenul din materialul examinat reacționează cu imunoglobulinele antivariolice fixate de eritrocite de berbec și le aglutinează.

Prin RID depistăm în prelevatele patologice antigenul care reacționează cu ser imun antivariolic. Concentrația minimă de antigen depistată prin această reacție este de 10^4 unități formatoare de *pock-uri/ml*.

Testul ELISA poate fi utilizat în variantele directă și indirectă.

53.2.1.3. Izolarea virusului

Izolarea virusului din prelevatele patologice se face prin infectarea ouălor embrionate de găină sau a culturilor de celule. Ambele metode sunt sensibile.

Embrionii de găină de 11—12 zile sunt infectați, prin metoda închisă, pe membrana corioalantoidiană (MCA). După 3—5 zile de incubație la 35°C , pe MCA apar focare mici, alburii, dense, bine conturate, proeminente «în cupolă» (*pock-uri*), înconjurate uneori de o zonă transparentă. Aceste *pock-uri* diferă de cele formate de virusul vaccinei, care sunt mari de 3—5 mm, plate, cu margini festonate, de culoare gălbuie.

În cazul virusului variolic nu survine moartea embrionului, virusul vaccinei îl omoară după 3—5 zile de la infectare.

Identificarea virusului izolat se face prin RN pe ouă embrionate, RFC, RIHA cu eritrocite de găină. Tulpinile de virus variolic proaspăt izolate au activitate hemaglutinantă slabă.

Culturi de celule mai sensibile pentru izolarea virusului variolic sunt liniile continue HeLa, Hep, FL, în care provoacă, după 3—4 zile, efect citopatic manifestat prin focare de celule proliferate, bine conturate. Virusul vaccinal dă efect citopatic peste 24 ore cu formare de celule gigante și sinciții. La temperatura de $39\text{—}40^{\circ}\text{C}$ virusul variolic, spre deosebire de cel vaccinal, nu este replicat.

Identificarea virusului izolat în culturi de celule se face prin RIF, RIHAI, RID.

Se recomandă și *testul Paul*: inocularea materialului din leziunile tegumentare de la bolnav pe corneea de iepure scarificată. În cazul variolei, după 1—2 zile, apar vezicule sau se pun în evidență incluziuni Guarnieri.

53.2.2. Diagnosticul serologic

Pentru diagnosticul serologic al variolei se urmărește dinamica anticorpilor antivariolici prin RIHA, RFC sau RN pe embrioni de găina sau în culturi de celule cu seruri pereche inactivate 30 minute la 56°C . Toate reacțiile sunt sensibile.

Anticorpilor inhibitori ai hemaglutinării apar după 5—6 zile de boală și titrul lor crește în următoarele 1—2 săptămâni. Pentru RIHA se utilizează ca antigen suspensie din MCA a embrionilor de găină infectați cu virus vaccinal sau antigen hemaglutinant standardizat.

În RFC și RN se folosesc ca antigen extracte preparate din MCA sau culturi de celule

congelate și decongelate de trei ori. În RN se urmărește anularea efectului citopatic și hemadsorbției în culturi de celule sau a formării *pock*-urilor pe MCA a embrionilor de găină.

53.2.3. Preparate pentru diagnostic, profilaxie și tratament

- Antigen standardizat pentru RIHA.
- Eritrocite sensibilizate cu imunoglobuline antivariolice pentru identificarea antigenului prin RIHA.
- Trusă pentru RID.
- Imunoglobulina antivariolică administrată intramuscular (3—6 ml) în scop terapeutic.
- Vaccin atenuat antivariolic. În prezent nu este utilizat pentru că variola este o boală eradicată.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI CU VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV)

54.1. DATE GENERALE

54.1.1. O minidefiniție și reperi structurale

Virusul imunodeficienței umane este un retrovirus, adică un virus al cărui genom ARN este transcris în celula gazdă în secvențe de ADN proviral de către reverstranscriptaza asociată genomului viral și care este o enzimă unică în biologie (la toate celelalte organisme transcrierea mesajului genetic se face din secvențele ADN în secvențe ARN).

Virionii HIV sunt sferici, cu diametrul de 100—140 nm și au o structură complexă, care include:

- Un nucleoid cilindric cuprins într-un înveliș format din proteina p24 dublat de alt înveliș format din proteina p17.

- O anvelopă lipoproteică în care sunt înfipte, radiar, complexele formate din glicoproteinele gp41 și gp120.

Genomul cuprins în nucleoid este ARN m. c., liniar \leftrightarrow și are asociate câteva proteine, dintre care reținem două enzime: reverstranscriptaza și integraza.

Harta genetică a HIV include 10 gene care codifică:

- proteine structurale ale virionului: *gag* codifică proteinele asociate nucleoidului (e. g. p24, p17 etc.), *pol* — reverstranscriptaza, *env* — glicoproteinele anvelopei gp41 și gp120, LTR — inițiatorii transcripției;

- proteine de reglare a replicării: genele *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *nef*.

HIV este foarte sensibil la acțiunea eterului, detergenților și, în general, a factorilor de mediu extern.

54.1.2. Reperi taxonomice

Virusul HIV face parte din familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*, care reunește agenți ai unor infecții lente (cu incubajie și evoluție îndelungate). Are două serovaruri: HIV-1 și HIV-2.

54.1.3. Habitat

În afară de HIV sunt cunoscute și virusuri ale imunodeficienței altor mamifere (ale maimuțelor, ale felinei).

54.1.4. Factori de patogenitate

Glicoproteina gp120 este un ligand care are ca receptor antigenul CD4 de pe membrana limfocitelor T4 (limfocitele T *helper*), a monocitelor, macrofagelor și celulelor dendritice din foliculii limfoizi.

După endocitare și decapsidare în citoplasmă, reverstranscriptaza transcrie ARN viral în catenă ADN, care, la rândul ei, servește ca matriță pentru formarea ADN proviral d. c., care se integrează liniar în genomul celei gazdă, unde rămâne latent lungi perioade de timp. Exprimarea provirusului (transcrierea în ARN_m, sinteza proteinelor virale, morfogeneza virionilor și eliberarea lor cu liza celulelor gazdă) se produce când limfocitele T4 sunt activate în răspunsul imun față de antigenii HIV sau prin infecții microbiene secundare. Cele mai afectate sunt limfocitele T4 din cauza densității mari a receptorilor de membrană. Modificări histopatologice apar însă și în foliculii limfoizi.

Glicoproteina gp41, exprimată pe membrana celulelor infectate, funcționează ca factor de fuziune celulară și determină apariția de celule multinucleate.

Astfel glicoproteinele gp120 și gp41 acționează ca imunosupresori prin scăderea numărului de limfocite T4 și prin perturbări în prezentarea antigenului.

De distrugerea limfocitelor T4 este responsabil și un răspuns autoimun față de antigenul CD4 modificat prin fixarea HIV.

Hipervariabilitatea gp120 face inoperant răspunsul imun al gazdei față de acest esențial factor de patogenitate al HIV.

54.1.5. Receptivitatea la infecția cu HIV

Receptivitatea la infecția cu HIV este generală.

54.1.6. Infecția cu HIV

Infecția cu HIV este deci o infecție lentă, caracterizată prin afectarea selectivă a limfocitelor T *helper* cu o depresie ulterioară profundă și globală a imunității și moarte cauzată de infecții secundare (oportuniste). Clinic deosebim:

- Infecție asimptomatică.
- Infecție acută.
- Limfadenopatia persistentă generalizată.
- Sindromul de imunodeficiență dobândită (SIDA) manifestat prin reactivări ale unor infecții cu microorganisme oportuniste (manifestări cutanate, pulmonare, gastrointestinale, meningoencefalitice ș. a.); neoplazii; demență.

54.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIEI CU HIV

Se prelevă și se examinează, în funcție de manifestările clinice: sânge, lichid cefalorahidian, spermă, material biptic sau necroptic (ganglioni limfatici, măduvă osoasă, fragmente de splină).

Mai accesibil este *diagnosticul serologic*, care permite depistarea anticorpilor specifici față de glicoproteinele virale de înveliș (gp41, gp120) sau proteina p24 a miezului. În acest scop se utilizează testul ELISA cu truse comercializate de diverse firme.

Ca test de confirmare a rezultatelor obținute prin ELISA folosim *imunoblotingul*: în prealabil se efectuează separarea proteinelor virale prin electroforeză în gel, apoi transferarea acestora pe membrană de nitroceluloză, care se tratează cu serul de examinat. Complexul antigen-anticorp se developează cu ser antiglobulinic marcat cu peroxidază.

Detectarea virusului sau a antigenilor virali se efectuează prin RIF, ELISA sau ARI.

Pentru *izolarea HIV* se utilizează culturi de limfocite T activate cu interleuchină-2 (factor de creștere), pe culturi de celule T *helper* (tulpina H9). Urmărim formarea de sinciții și moartea rapidă a celulelor. Pe suprafața și în interiorul limfocitelor infectate virusul poate fi depistat la microscopul electronic.

Identificarea tulpinilor virale izolate se face prin RN, ELISA sau RIF cu seruri imune obținute de la persoane seropozitive.

Preparate specifice utilizate în profilaxie și tratament nu sunt elaborate. Un anumit interes prezintă unele preparate imunostimulatoare ca timozina, interleuchinele, T-activina, levamizolul; preparate care împiedică multiplicarea virusului (ribavirin, azidotimidină).

Partea a patra

•

MICROBIOLOGIE SANITARĂ

MICROBIOLOGIA SANITARĂ: DEFINIȚIE ȘI OBIECTIVE

Microbiologia sanitară studiază microorganismele mediului ambiant (inclusiv cele patogene), care prin activitățile lor pot influența, direct sau indirect, sănătatea omului. Obiectivele microbiologiei sanitare sunt următoarele:

- elaborează și perfecționează metodele de examinare microbiologică a elementelor de mediu: apă, aer, sol, produse alimentare, obiecte de uz curent etc.;
- studiază căile prin care omul și animalele contaminează elementele mediului ambiant;
- elaborează standarde de stat (STAS), norme și indicații metodice privind recoltarea, conservarea, expedierea și examinarea probelor de mediu;
- elaborează recomandări și măsuri pentru asanarea elementelor de mediu și controlează eficiența lor;
- studiază legitățile relațiilor omului cu mediul ambiant și elaborează recomandări pentru protecția sănătății.

Elementele de studiu sunt foarte diferite: apa (potabilă, din râuri și lacuri, apele reziduale), aerul (atmosferic și din încăperi), solul, produsele alimentare (laptele și produsele lactate, carnea, peștele, conservele ș.a.), obiectele de uz curent, utilajul, inventarul și personalul întreprinderilor de alimentație publică și de comerț alimentar cu amănuntul, instituțiilor de copii și medicale (creșe, grădinițe, spitale, maternități ș.a.).

INDICATORI MICROBIOLOGICI DE POLUARE A MEDIULUI AMBIANT

56.1. DEFINIREA INDICATORILOR MICROBIOLOGICI DE POLUARE

Examenul microbiologic al elementelor de mediu are ca scop aprecierea prezenței sau lipsei în acestea a microorganismelor care prezintă pericol pentru sănătatea omului.

Aprecierea calității elementelor mediului ambiant se face nu direct, prin depistarea agenților patogeni ai bolilor infecțioase (aceștia nu se întâlnesc permanent, sunt sensibili la acțiunea multor factori, cantitatea lor este relativ mică), ci indirect, prin determinarea gradului de contaminare cu reprezentanți ai microflorei normale, care se elimină în mediu cu excrețiile omului și animalelor. E.g. depistând microorganisme care normal reprezintă microflora intestinului, putem concluziona despre o poluare fecală și, deci, nu se exclude posibilitatea eliminării cu materiile fecale a agenților patogeni ai dizenteriei, febrilor tifoparatifoidice etc. Izolarea reprezentanților microflorei normale servește ca un indice al stării sanitare a elementelor de mediu, ceea ce permite aprecierea pericolului potențial al acestor elemente pentru sănătatea omului. Asemenea microorganisme au fost numite *indicatori microbiologici*.

Însă nu toate microorganismele din flora normală a corpului uman și animal pot fi indicatori microbiologici. În urma unor multiple investigații au fost formulate o serie de condiții pe care trebuie să le îndeplinească microorganismele indicatoare, și anume:

- să fie prezente constant în excrețiile omului și animalelor și să se elimine în mediul extern în cantități masive;
- să nu aibă alt rezervor natural decât organismul omului și animalelor;
- să supraviețuiască în mediul ambiant timp mai îndelungat în comparație cu microbii patogeni;
- să lipsească sau să fie redusă capacitatea de multiplicare în mediul extern;
- să fie mai rezistenți la acțiunea factorilor din mediul extern decât microbii patogeni;
- să fie suficient de tipici, pentru a fi ușor diferențiați și să nu-și modifice caracterele biologice;
- să fie ușor depistați prin metode uzuale, simple și accesibile.

Analizele de laborator se efectuează în conformitate cu standardele de stat (STAS), indicațiile și recomandările metodice, care sunt strict obligatorii pentru toate laboratoarele. Aceste documente prevăd:

- a) metodele de recoltare a probelor;
- b) cantitatea de produs recoltat;

- c) condițiile de expediere;
- d) metodică examinării;
- e) criteriile de interpretare a rezultatelor analizei.

Fiecare probă recoltată e însoțită de o fișă, în care indicăm: denumirea probei, locul recoltării și cantitatea, data recoltării (anul, luna, ziua, ora), scopul analizei, instituția care va efectua analiza, numele persoanei care a recoltat proba.

În prezent, în funcție de elementul de mediu examinat, indicatorii microbiologici includ microorganisme ca *Escherichia coli*, coliformii, enterococii, *Proteus*, stafilococii, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* ș.a.

Aprecierea calității elementelor mediului ambiant se face de asemenea prin determinarea numărului total de microorganisme (NTM) pe unitate de volum sau suprafață.

Pentru fiecare element sunt stabiliți indicatorii microbiologici, conform cărora se apreciază starea sanitară a lui. E.g. pentru apă: *E.coli*, coliformii; pentru aer: stafilococii și streptococii etc.

În investigațiile microbiologice sanitare trebuie să se respecte următoarele principii:

- a) recoltarea, conservarea și expedierea corectă a probelor;
- b) efectuarea analizelor în serie (din diferite sectoare);
- c) recoltarea repetată a probelor;
- d) utilizarea metodelor standard de analiză;
- e) aprecierea datelor în coroborare cu alte rezultate ale examenului igienic (chimice, fizice, organoleptice);
- f) responsabilitatea medicilor pentru exactitatea analizelor și motivația concluziilor despre starea sanitară a elementului examinat.

56.2. CARACTERISTICI ALE INDICATORILOR MICROBIOLOGICI

56.2.1. Grupul coliformilor

Noțiunea de coliformi sau coliformi totali include *Enterobacteriaceae* din genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ș.a., caracterizate ca bacili gramnegativi, nesporulați, oxidazonegativi, care degradează glucoza cu producere de acid și gaz la temperatura de 37°C în interval de 24—48 ore. Acest grup este prezent în cantitate mare în fecalele omului și animalelor cu sânge cald.

Bacteriile coliforme care își manifestă caracterele metabolice și la temperatura de 44 ± 0,5°C se numesc coliformi fecali sau termotoleranți. Coliformii fecali, care degradează lactoza cu acid și gaz la 44 ± 0,5°C și nu cresc pe mediul cu citrat (mediul Simmons), sunt considerați a fi *E.coli*, un indicator incontestabil al unei poluări fecale recente. Diferențierea genului se limitează, până nu demult, la testele IMVEC, care includeau următoarele caractere: producerea indolului (I), reacția cu roșu metil (M), reacția Voges-Proskauer (V), creșterea în mediul Eijkman (E) la temperatura de 43—44°C și creșterea pe mediul cu citrat (C). Aceste teste s-au dovedit a fi insuficiente, deoarece coliformii izolați din apa clorinată nu fermentează glucoza cu gaz la 43°C și aceste teste nu prevăd testul oxidazei. Astăzi identificăm coliformii prin următoarele caractere diferențiale:

- a) Incubarea culturilor numai la 37°C.
- b) Caracterul creșterii pe mediul Endo: se iau în considerație numai coloniile roșu-închis cu sau fără luciu metalic.
- c) Bacili gramnegativi.
- d) Testul oxidazei. Pentru identificarea ulterioară selectăm numai colonii oxidazonegative, pentru că cele oxidazopozitive includ bacterii gramnegative, care aparțin pseudomonadelor, aeromonadelor sau vibriunilor.
- e) Degradarea glucozei cu formare de acid și gaz.

56.2.2. Enterococii (streptococii fecali)

Enterococii fac parte din microflora normală a intestinului omului și animalelor și se elimină în mediu ambiant în cantități destul de mari, 10^{8-9} UFC/g de fecale, dar aproximativ de zece ori mai puțin în comparație cu coliformii. Enterococii sunt al doilea indicator microbiologic, după coliformi, când examinăm apa din zonele de recreație, din bazinele de înot, apele reziduale ș.a. După structura antigenică acești streptococi sunt incluși în grupul D Lancefield. Se deosebesc două specii: *Enterococcus faecalis* cu variantele *liquefaciens* și *zymogenes* și *E. faecium* cu varianta *durans*.

Enterococii sunt coci ovali, dispuși izolați, în perechi sau lanțuri scurte, grampozitivi, în general imobili și nesporulați. Pe medii solide formează colonii mici, transparente, bombate, rotunde, cu margini regulate și suprafață lucioasă. Sunt catalazonegativi. Li diferențiem de alți streptococi prin următoarele teste:

- a) Cresc în bulion bilit 40%.
- b) Se dezvoltă în prezența azidei de sodiu (inhibitor pentru coliformi și alte bacterii gramnegative).
- c) Cresc la pH 9,6 și în bulion cu 6,5% clorură de sodiu.
- d) Cresc între 10 și 45°C.
- e) Reduc albastrul de metilen din lapte.

Sunt rezistenți la acțiunea clorului, coloranților și unor antibiotice.

E. faecalis și *E. faecium* se diferențiază după capacitatea de fermentare a glicerinei: primul o descompune în condiții aerobe și anaerobe, al doilea numai în condiții aerobe. *E. faecalis* reduce trifeniliterazolcloridul (TTC), din care cauză pe medii cu TTC formează colonii roșii-vișinii, pe când *S. faecium* crește sub formă de colonii incolore (uneori cu centrul roz).

Pentru că enterococii mor mai repede decât coliformii și nici nu se multiplică în mediul ambiant (exceptând unele alimente), ei sunt considerați ca indicator microbiologic al unei poluări fecale recente.

56.2.3. Clostridii sulfitoreducătoare

Clostridiile, ca și enterococii și coliformii, fac parte din microflora intestinală normală a omului și unor animale cu sânge cald și se elimină în mediu cu fecalele. Concentrația lor ajunge până la 10^6 UFC/g de fecale. Indicator microbiologic este specia *C. perfringens*, capabilă să reducă sulfitul în sulfură feroasă la 45°C după 12—14 ore.

C. perfringens aparține familiei *Bacillaceae* și apare ca bastonașe lungi, imobile, sporulate și, în organismul gazdă, capsulate. Cultivă pe medii uzuale. Intens zaharolitic,

degradează glucidele cu formare de acid și gaz. Coagulează repede laptele (2—5 ore), formând cheag spongios «aruncat» spre dopul eprubetei din cauza gazului. Avantajul acestei specii ca indicator microbiologic este depistarea ei prin metode simple, rapide și lipsa necesității identificării ulterioare. Totodată, *C. perfringens* fiind sporogen are rezistență sporită în mediul extern, din care cauză este considerat ca indicator al poluării fecale mai vechi. O cantitate crescută de clostridii depistată însă alături de coliformi indică o poluare fecală recentă.

Determinarea acestui indicator este recomandată la examenul microbiologic al solului, apelor reziduale, depunerilor din bazinele acvatice, la selectarea sursei de aprovizionare cu apă ș.a.

56.2.4. Stafilococii

Stafilococii sunt reprezentanți ai microflorei normale a corpului uman. Colonizează pielea, căile aerodigestive superioare, în special nasul; sunt prezenți și în intestin. În timpul vorbirii, tusei, strănutului și cu scuamele ei se elimină ușor în mediul înconjurător: în aer, pe obiecte; în apă în timpul scăldatului.

Stafilococii sunt considerați ca un indicator al poluării aerului din încăperile închise (staționare chirurgicale, de copii, secții de reanimare și terapie intensivă, maternități). Totodată, luând în considerație rezistența stafilococilor la substanțele dezinfectante, ei sunt și indicatori ai poluării apei în zonele de recreație, în bazinele de înot, unde numărul de stafilococi poate ajunge la zeci de mii UFC/litru.

Stafilococii aparțin familiei *Micrococcaceae*, genul *Staphylococcus* cu trei specii mai frecvent izolate: *S. aureus*, *S. epidermidis* și *S. saprophyticus*. Sunt coci sferici, gram-pozitivi, așezați în ciorchini, nesporulați, necapsulați și imobili. Cresc pe medii uzuale. Pe geloză-sânge unele tulpini sunt hemolitice. Formează colonii rotunde, bombate, netede, lucioase și pigmentate în auriu, galben sau alb. *S. aureus*, specia cu cel mai mare potențial patogen, produce coagulază, lecitinază, ADN-ază; unele tulpini elaborează enterotoxină termorezistentă. Ca indicatori microbiologici, stafilococii se depistează ușor, prin metode obișnuite.

Testele uzuale pentru identificarea stafilococilor sunt:

- a) Capacitatea de a crește în medii cu concentrații sporite de NaCl (7—10%).
- b) Determinarea coagulazei.
- c) Fermentarea manitei în condiții anaerobe.
- d) Determinarea sensibilității la novobiocină.
- e) Producerea de lecitinază și fosfatază.

În cazul investigațiilor epidemiologice, pentru determinarea sursei de infecție și a căilor de răspândire, se determină fagovarul cu ajutorul setului internațional constituit din 20 fagi.

56.2.5. Streptococii

Streptococii sunt găzduiți în căile aerodigestive superioare ale omului și multor animale, mai ales la persoane cu infecții respiratorii cronice, eliminându-se în aer cu saliva, sputa, în timpul vorbirii, tusei, strănutului.

Genul *Streptococcus* include un mare număr de specii atât saprofite, cât și patogene. În patologia omului importanță mai mare are *S. pyogenes*. Streptococii sunt coci sferici,

grampozitivi, așezați în lanțuri, imobili, nesporulați; unele tulpini patogene sunt capsulate. Nu cresc pe medii uzuale. Cultivă în bulion glucozat și pe geloză-sânge. În bulionul glucozat cresc pe pereții și la fundul eprubetei, lăsând mediul transparent. Pe geloză-sânge formează colonii mici, albe-cenușii, opace. După capacitatea hemolitică deosebim:

- streptococii β -hemolitici, cu coloniile înconjurate de o zonă largă de hemoliză completă, clară;
- streptococii α -hemolitici, care transformă hemoglobina în methemoglobină și înverzesc mediul în jurul coloniilor;
- streptococii γ sunt nehemolitici și nu modifică mediul cu sânge.

Mai perfectă este clasificarea streptococilor după structura antigenică, propusă de Lancefield. Sunt cunoscute 19 serogrupuri de streptococi și un mare număr de serovaruri. Majoritatea streptococilor piogeni aparțin grupului A cu 57 serovaruri.

În mediul ambiant streptococii sunt reprezentați de regulă de streptococii α -hemolitici, pe care li găzduim constant. Streptococii β -hemolitici se găsesc mai puțin frecvent în faringele oamenilor sănătoși. Depistarea lor în aer are importanță sanitară și epidemiologică, pentru că indică prezența bolnavilor sau purtătorilor sănătoși.

Depistarea și identificarea streptococilor se face ceva mai complicat, dar utilizând în mare parte testele descrise la identificarea enterococilor.

56.2.6. Genul *Proteus*

Bacteriile din genul *Proteus* sunt foarte răspândite în natură, unde participă la procesele de descompunere. Se întâlnesc în ape poluate, alimente alterate, în special în carne și derivate. În cazul unei contaminări masive a produselor alimentare, aceste bacterii pot cauza toxiiinfecții alimentare. Răspândirea bacteriilor din genul *Proteus* este posibilă prin intermediul obiectelor de uz curent, prin aerul încăperilor în care se găsesc bolnavi cu procese inflamatorii sau infecții intestinale cauzate de bacterii din acest gen.

Speciile de *Proteus* servesc ca indicator microbiologic în industria alimentară, demonstrând o contaminare fecală recentă survenită în diferite etape ale circuitului alimentelor.

Genul *Proteus* este inclus în familia *Enterobacteriaceae* și se disting 4 specii, dintre care mai frecvent se izolează *P. vulgaris* și *P. mirabilis*. Sunt bacili scurți, gramnegativi, dispuși în perechi sau lanțuri mici, mobili cu cili peritrichi, nesporulați și necapsulați. Cresc pe medii uzuale. O particularitate tipică pentru aceste bacterii este capacitatea «de roire»: pe medii solide formează un văl fin, care se extinde pe toată suprafața mediului. Izolarea se face ușor prin însămânțarea produsului de examinat în apă de condensare a tuburilor cu geloză înclinată (metoda Schukevici). Se observă o creștere specifică serpinginoasă (fenomen de «cătărăre»).

Identificarea culturilor izolate se efectuează după unele teste biochimice: producerea indolului și H_2S , prezența fenilalanindezaminazei, hidroliza ureei, creșterea pe medii cu citrat ș.a. Identificarea antigenică se face prin reacții de aglutinare cu serurile specifice O și H.

56.2.7. *Pseudomonas aeruginosa*

Această specie, larg răspândită în natură, este inclusă în genul *Pseudomonas*, familia *Pseudomonadaceae*. Se izolează din apele de suprafață și reziduale, din sol, de pe plante, din intestinul și de pe tegumentele omului, din diverse preparate medicamentoase. Este

agentul infecției piocianice intraspitalicești. Cauzează la om diverse procese supurative: otite, pielite, cistite, cheratite, meningoencefalite, septicemii, infectează plăgile și arsurile.

În mai multe țări s-au elaborat standarde pentru supravegherea calității apelor folosite în scopuri recreaționale în care ca indicator microbiologic este recomandată depistarea *P. aeruginosa*. Prezintă interes și pentru aprecierea condițiilor igienice de preparare în spitale a unor forme medicamentoase, a alimentelor pentru nou-născuți. Depistarea acestei specii este recomandată și pentru analiza calității apelor minerale îmbuteliate.

P. aeruginosa este un bacil polimorf, gramnegativ, dispus izolat, în perechi sau lanțuri scurte, foarte mobil, cu 1—3 flageli polari, nesporulat și, de regulă, necapsulat. Este strict aerob, cultivă pe medii uzuale, formând pe geloză colonii mari, S, pigmentate în verde-albăstrui sau roșu-brun. Nefermentativ, nu produce indol, lichefiază gelatina și serul coagulat, reduce nitrații în nitriți, este oxidazopozitiv. Aceste caractere biochimice și pigmentogeneza stau la baza identificării tulpinilor izolate în laborator.

56.2.8. Enterofagii

Enterofagii sunt virusuri care parazitează și se reproduc în enterobacterii vii. Ajung în mediul ambiant din intestinul omului. Aceasta permite să-i utilizăm ca indicatori ai contaminării mediului și cu enterobacterii patogene. Multiplele investigații sanitarovirusologice au demonstrat posibilitatea folosirii enterofagilor și ca indicator al poluării virale cu enterovirusuri, virusul hepatitei A, adenovirusuri ș.a. Cu ajutorul enterofagilor s-a studiat eficiența diverselor metode de epurare și dezinfecție a apei potabile, apelor reziduale și se stabilesc criteriile pericolului epidemiologic al apelor pentru sănătatea omului.

Enterofagii, ca și coliformii și enterococii, servesc ca indicator al poluării fecale a apei.

În bazinele acvatice enterofagii pot fi și indicatori ai proceselor de autoepurare; cu ajutorul lor se pot depista sursele și căile de răspândire a impurificării organice.

În examenul microbiologic sanitar al apei uzual se utilizează bacteriofagul antitific Vi și bacteriofagul anti-*coli*. Izolarea bacteriofagilor respectivi, capabili să se multiplice numai pe tulpinile omoloage de bacterii, demonstrează evident și prezența acestor bacterii în probele examinate cu o vădită importanță epidemiologică.

Depistarea prezenței enterofagilor în elementele mediului ambiant se poate face în orice laborator bacteriologic, utilizând dotările obișnuite (medii de cultură uzuale etc.). Determinarea titrului enterofagilor se efectuează prin metoda bistratificată pe geloză, care permite aprecierea cantitativă a fagilor în unități formatoare de plaje (UFP) într-o unitate de volum sau masă a materialului de examinat (apă, sol ș.a.).

56.2.9. Microorganisme termofile

În grupul microorganismelor termofile sunt incluse bacterii grampozitive, coci, bacili, spirili, actinomicete și unele specii de ciuperci care au capacitatea să se multiplice activ la 60°C sau mai mult, în majoritate fiind aerobe. Prezența acestui grup în elementele mediului ambiant (sol, bazine acvatice, conserve ș.a.) indică o impurificare cu dejecte și excreții, cu deșeuri solide menajere și agricole în care pot fi depistate și microorganisme patogene

periculoase pentru sănătatea omului. De aceea microorganismele termofile sunt considerate ca un indicator microbiologic de poluare a mediului înconjurător.

În materiile fecale ale omului și animalelor concentrația termofililor este de regulă redusă (10^{1-3} germeni/g) și nu servesc ca indicator al poluării fecale a mediului. Impurificarea solului și a bazinelor acvatice cu germeni termofili are loc în cazul poluării cu deșeuri menajere care conțin materie organică în diferite stadii de descompunere. Prezența microorganismelor termofile în sol demonstrează o impurificare mai veche cu deșeuri. Despre o impurificare fecală recentă vorbește titrul înalt al coliformilor și o concentrație mică de termofili.

Materialul prelucrat în laboratoarele de microbiologie conține agenți infecțioși cu risc pentru personalul de laborator și pentru colectivitate. Clasificarea acestor agenți infecțioși după gradul de risc a fost prezentată în partea întâi, 1.5.

EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL APEI

57.1. DATE GENERALE: CADRUL PROBLEMEI ȘI INDICAȚII

Flora microbiană a apelor naturale depinde în mare măsură de originea lor. Se deosebesc:

- a) ape superficiale (dulci), care cuprind apele curgătoare din râuri, pârâuri și apele stătătoare din lacuri, iazuri, diverse rezervoare;
- b) ape subterane din izvoare, fântâni arteziene;
- c) ape atmosferice provenite din zăpadă, ploaie;
- d) ape de mare.

Din punctul de vedere al utilizării distingem:

- a) apa potabilă și menajeră din sisteme centralizate de aprovizionare și necentralizate (fântâni, izvoare, arteziene);
- b) apa bazinelor de înot;
- c) gheața medicinală și menajeră;
- d) apele reziduale (fecaloid-menajere, industriale, mixte).

Analiza bacteriologică sanitară a apei se efectuează pentru controlul curent al calității apei potabile furnizată de instalații centrale sau din surse locale la toate etapele aprovizionării începând de la locul captării, la instalațiile de epurare, în diferite puncte din rețeaua de distribuție, până la robinetele apeductului intern.

Apa bazinelor de înot se examinează în mod planificat (controlul curent) și la indicații epidemiologice. Apa din bazinele de înot trebuie să corespundă cerințelor apei de robinet.

Analiza *apelor de suprafață* se face pentru aprecierea posibilității folosirii rezervorului de apă ca sursă de aprovizionare cu apă potabilă și menajeră sau în scopuri recreaționale, uneori în scopul determinării sursei de poluare fecală și pentru aprecierea capacității de autoepurare.

Scopul examenului bacteriologic sanitar al *apelor reziduale* este de a controla eficiența epurării și dezinfecției lor și a sedimentului. Se verifică corectitudinea exploatării instalațiilor de epurare, ceea ce permite depistarea din timp a pătrunderii microorganismelor patogene în rezervor o dată cu apele reziduale.

În concluzie, examenul bacteriologic sanitar al apei se efectuează pentru:

- selectarea surselor de alimentare centrală cu apă potabilă și menajeră;
- controlul periodic al eficienței dezinfecției apei potabile furnizată de instalații centrale;
- determinarea calității apei utilizate din surse locale;

■ controlul stării sanitaro-epidemiologice a apelor bazinelor deschise (lacuri, iazuri, fluvii);

■ controlul eficienței dezinfecției apei din bazinele de înot;

■ controlul calității epurării apelor reziduale;

■ investigarea izbucnirilor hidrice de boli infecțioase.

Realizarea acestor scopuri este prevăzută în următoarele documente normative: STAS 2761-84 «Sursele de alimentare centrală cu apă potabilă și menajeră»; STAS 2874-82 «Apă potabilă. Cerințele igienice și controlul calității»; STAS 18963-73 «Apă potabilă. Metodele analizei sanitaro-bacteriologice»; Indicațiile metodice 2285-81 «Cu privire la analiza sanitaro-microbiologică a bazinelor deschise».

Încadrarea apelor în prevederile standardelor de stat se efectuează după următorii indicatori microbiologici:

■ titrul și indicele coliformilor, coliformilor fecali, enterococilor, stafilococilor;

■ numărul total de microorganisme.

La indicații epidemiologice se determină prezența microorganismelor patogene (salmonele, shigele, leptospire, vibriionul holerici ș.a.).

57.2. EFECTUAREA ANALIZEI

57.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor de apă

Probele de apă se recoltează în flacoane sterile prevăzute cu dopuri de sticlă sau de vată în tifon și capac de hârtie legat cu sfoară în jurul gâtului.

Apa de conductă se recoltează în volum de 500 ml direct la robinet. În prealabil se frământă robinetul cu un tampon de vată îmbibat cu alcool, apoi se deschide complet și se așteaptă să curgă apa 10 minute. Se scoate dopul și se menține flaconul sub coloana de apă pentru a-l umple până la cca 1 cm sub dop. Apa clorinată se recoltează în flacoane cu declorator: 10 mg hiposulfid de sodiu pentru 500 ml apă. Se astupă flaconul cu dopul, se fixează cu sfoară capacul de hârtie și se etichetează. În documentul însoțitor se indică: locul, data (ziua, luna, anul) și ora recoltării, analizele solicitate și numele persoanei care a recoltat proba.

Din *izvoare* se recoltează proba direct din curentul de apă sau din mijlocul izvorului, la adâncime de 10—15 cm de la suprafață. De la aceeași adâncime se recoltează și apa din *fântâni* sau din *fântâni arteziene*.

Din *bazinele deschise* se recoltează o serie de probe la distanțe diferite de mal și la diferite adâncimi cu ajutorul unor *batometre*, care sunt flacoane cu suport metalic. În acest caz, în documentul de însoțire se indică distanța de la mal, adâncimea, distanța surselor de poluare, viteza scurgerii, temperatura apei și aerului.

Volumul *apelor reziduale* recoltat pentru analiză este diferit în funcție de scopul analizei și locul recoltării (la etapele de epurare, după dezinfectare, la locul scurgerii) și variază de la 10 la 500 ml.

Gheața se recoltează în bucăți de 2 kg, iar în laborator se spală cu apă sterilă și, din profunzime, se taie cu instrumente sterile câteva bucăți cu masa totală de 500 g, care se introduc în vas steril, se mențin la temperatura camerei până la topire, apoi se examinează.

Pentru *depistarea microorganismelor patogene*, în funcție de gradul prezumptiv de

impurificare, se recoltează 3 litri de apă de robinet, 1 litru apă din bazinele deschise, 50—100 ml ape reziduale.

Probele de apă se transportă în truse frigorifice sau în lăzi termoizolate în care se menține temperatura de 1—2°C. Analiza apei trebuie făcută în cel mult 2 ore din momentul recoltării. Temporizarea examenului până la 6 ore se admite excepțional dacă se păstrează proba la +4°C. Probele primite în laborator se înregistrează în registre speciale.

57.2.2. Determinarea numărului total de microorganisme (NTM)

Numărul total de microorganisme include germeii mezofili saprofiți, facultativ anaerobi, care populează rezervorul de apă și sunt capabili să formeze, pe mediile de cultură, colonii vizibile cu ochiul liber sau cu lupa la mărire de 2—5X.

Când se examinează apa curată, se pipetează aseptice câte 1 ml, din probele nediluate, în două cutii Petri sterile, în care se toarnă imediat câte 5—7 ml geloză nutritivă topită și răcită la 45°C. Se omogenizează conținutul cutiilor și se repartizează uniform prin mișcări ușoare de rotație, fără a ridica cutia de pe suprafața mesei. După solidificarea gelozei, cutiile se introduc în termostat, cu capacul în jos, pentru incubare.

Dacă se examinează apă mai impurificată (din rezervoare deschise, ape reziduale), se pregătesc diluții decimale succesive: se pipetează 1 ml apă nediluată într-o eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă, se omogenizează amestecul și se obține diluția 10⁻¹; 1 ml din această diluție se transferă în altă eprubetă cu 9 ml apă sterilă, pentru a obține diluția 10⁻² etc. Pentru fiecare diluție se utilizează o pipetă aparte. În funcție de gradul impurificării se pregătesc diluții de la 10⁻¹ la 10⁻⁶. Din fiecare diluție, folosind pipete noi, sterile, se însămânțează câte 1 ml în 2 cutii Petri sterile și se toarnă geloză nutritivă ca și la analiza apei nediluate.

Când se examinează *apa furnizată de instalațiile centrale sau din surse de aprovizionare cu apă potabilă și menajeră, din zonele de recreație, bazinele de înot, se determină numărul de microorganisme saprofite capabile să se dezvolte la 37°C în 24 ore.* Dar când se selectează o *sursă nouă de aprovizionare cu apă, trebuie să determinăm două grupe de microorganisme: numărul microorganismelor saprofite care se dezvoltă la 20—22°C în 48 ore și numărul celor care cresc la 37°C în 24 ore.* Deci trebuie să însămânțăm cu fiecare diluție 2 seturi de câte 2 plăci.

La temperatura de 20—22°C crește un număr considerabil mai mare de microbi mai activi în procesul de autoepurare a rezervorului de apă. În cazul unei poluări cu ape reziduale ambele grupe de microorganisme apar în cantități apropiate și de aceea dinamica numerică a acestui indice este considerată ca un indicator sensibil al poluării rezervorului de apă cu substanțe organice.

După incubare se numără toate coloniile crescute atât la suprafața, cât și în profunzimea gelozei. Pentru numărare se aleg plăcile însămânțate cu diluțiile din care au crescut între 40 și 300 de colonii, procedeu care minimizează eroarea. Numărarea se face pe fundul cutiei, marcând cu creionul fiecare colonie. Dacă nu ne putem încadra în această condiție și pe plăci au crescut mai mult de 300 colonii, recurgem la dispozitive speciale de numărare: o placă de sticlă împărțită în pătrate cu latura de 1 cm. Se numără coloniile din 10 pătrate în diferite sectoare ale plăcii și se determină numărul mediu de colonii într-un pătrat. Numărul total de colonii reiese din formula:

$$X = S \pi R^2,$$

unde:

X — numărul de colonii pe toată suprafața plăcii;

S — numărul de colonii per pătrat;

$\pi = 3,14$;

R — raza plăcii.

E.g., dacă S este egal cu 10 și raza cu 5 cm, atunci numărul de colonii crescute pe suprafața plăcii este $10 \times 3,14 \times 25 = 785$.

Numărătoarea coloniilor se simplifică, dacă folosim dispozitive cu contor automat: la contactul electrostiloului cu suprafața plăcii, unde este colonia, impulsul se transmite la contorul care înregistrează colonia, iar pe ecranul contorului apare cifra însumată a coloniilor.

Numărul total al bacteriilor/ml probă se calculează ca produs al numărului mediu de colonii per placă cu inversul diluției înșămânțate.

57.2.3. Determinarea coliformilor

Aceste bacterii pătrund în mediul ambiant, inclusiv în apă, cu materiile fecale ale omului și animalelor, din care cauză prezența lor indică o impurificare fecală. Numărul coliformilor în apă caracterizează gradul de poluare și, respectiv, pericolul epidemiologic de infecții intestinale.

Determinarea coliformilor se efectuează prin două metode: metoda membranelor filtrante și metoda titrării (fermentării).

57.2.3.1. Metoda membranelor filtrante

Prin această metodă se determină *indicele coli*: cantitatea de bacterii coliforme într-un litru de apă. Metoda este precisă, accesibilă și economică. Se bazează pe capacitatea membranelor filtrante de a reține pe suprafață bacteriile din apa examinată cu cultivare ulterioară pe medii diferențiale și identificarea lor.

Întrebuințăm membrane filtrante din nitroceluloză N2 și N3. În prealabil membranele, examinate macroscopic pentru a le exclude pe cele cu orificii sau fisuri, se fierb 10 minute în apă distilată. Fierberea se repetă de 3—5 ori cu schimbarea apei, pentru a înlătura resturile de solvenți utilizați la fabricarea lor. Se păstrează membranele uscate în apă distilată, iar în ziua analizei se mai fierb o dată timp de 10 minute. Filtrarea se efectuează cu dispozitivul filtrant Seitz sterilizat prin flambare cu un tampon de vată îmbibat cu alcool etilic. Cu o pensă sterilă se montează membrana filtrantă pe o rețea metalică, apoi se fixează pâlnia cu șuruburile de ajustare. Se acționează sistemul de vacuum (pompa de vid, trompa de apă) și se filtrează un volum de apă calculat în așa mod ca pe membrana filtrantă să crească cel mult 30 de colonii izolate. E.g se filtrează un volum de 333 ml de apă furnizată din instalații centrale sau 100 ml de apă din surse necentralizate ori din bazinele de înot. O probă se filtrează fracționat prin 2—3 membrane. Fiecare membrană, scoasă cu pensă sterilă, se aplică, cu suprafața pe care s-au fixat bacteriile în sus, pe o placă cu mediul Endo. Pe aceeași placă se pot aplica 3—4 membrane. După ce se marchează volumul filtrat prin fiecare membrană, numărul probei și data, se incubează plăcile 24 ore la 37°C. Dacă în volumul de apă filtrată sunt prezenți coliformi, pe suprafața membranelor filtrante cresc colonii tipice pentru bacterii coli: roșii-închis cu luciu metalic sau roz cu centrul roșu. Din colonii se efectuează frotiuri, care se colorează Gram și se examinează microscopic. Prin testul oxidazei se diferențiază coloniile de *Enterobacteriaceae* (oxidazonegative) de cele de *Pseudomonadaceae* (oxidazopozitive). Pentru această se transferă, cu pensă sterilă, membrana filtrantă cu colonii pe o hârtie de filtru îmbibată

cu reactivul α -naftoldimetilparafenilendiamină. Coloniile de coliformi sunt oxidazonegative (nu își modifică culoarea roșie) și semnifică o poluare fecală a apei. Coloniile care în interval de 2—5 minute devin albastre sunt oxidazopozitive și nu se iau în considerație.

În cazuri nesigure (colonii roz sau incolore, dar oxidazonegative) se studiază suplimentar capacitatea de fermentare a glucozei la 37°C cu formare de acid și gaz.

Pentru determinarea indicelui coli, numărul de colonii tipice pentru coliformi se înmulțește cu 1000 și se împarte la volumul de apă filtrată. E. g., se filtrează 300 ml apă prin 2 membrane pe care au crescut 2 și, respectiv, 4 colonii. Indicele coli va fi egal cu $(6 \times 1000) : 300 = 20$.

Titrul coli, cantitatea minimă de apă care conține o bacterie coliformă, se calculează împărțind 1000 la valoarea indicelui coli. Continuând exemplul de mai sus: $1000 : 2 = 500$ ml.

Conform cerințelor STAS, indicele coli maxim admis pentru apa potabilă este 3, iar pentru bazinele de înot 10.

57.2.3.2. Metoda titrării

Această metodă constă în determinarea titrului coli și a indicelui coli prin însămânșarea anumitor volume de apă în medii de îmbogățire incubate la 37°C cu repicare ulterioară pe mediul Endo și identificarea culturilor izolate. Ca mediu de îmbogățire servește bulionul peptonat cu glucoză/lactoza, indicator de pH și tuburi Durham pentru indicarea gazului. Volumele de apă însămânșate diferă în funcție de gradul impurificării. Astfel din probele prelevate:

- la intrarea în rețeaua de aprovizionare centrală și de la robinet se însămânșează câte 3 volume de 100 ml, 3 volume de 10 ml și 3 volume de 1 ml;
- la etapele de epurare și dezinfectare se însămânșează 100; 10; 1 și 0,1 ml;
- din apa bazinelor de suprafață se însămânșează 10; 1; 0,1 și 0,01 ml;
- din apele reziduale până la epurare se însămânșează câte 1 ml din fiecare diluție decimală de la 10^{-3} până la 10^{-6} , iar după epurare 1 și 0,1 ml din proba ca atare și câte 1 ml din diluțiile 10^{-2} și 10^{-3} . Volumele de 100 și 10 ml se însămânșează în flacoane cu mediu dublu concentrat, iar volumele de 1 și 0,1 ml în eprubete cu mediul normal concentrat. Recipientele însămânșate se incubează 24 ore la 37°C .

În etapa a doua, din eprubetele cu turbiditate, acid și gaz, se efectuează repicări în sectoare pe plăci cu mediul Endo, care, de asemenea, se incubează 24 ore la 37°C . Coloniile cu aspecte tipice pentru coliformi se controlează prin proba oxidazei. Prezența bacililor gramnegativi și oxidazonegativi permite formularea unui răspuns pozitiv. Apartenența la grupul coliformilor a coloniilor atipice (roz, incolore) se apreciază prin confirmarea că sunt bacili gramnegativi, care nu produc oxidază, dar degradează glucoza cu acid și gaz la 37°C . Rezultatele le exprimăm prin indicele coli și titrul coli, consultând tabelele speciale (tabelul 57.1 și 57.2).

Din grupul coliformilor se diferențiază *coliformii fecali*: bacili gramnegativi, nesporulați, care nu produc oxidază și degradează lactoza cu producere de acid și gaz după 24 ore la 37°C . Numărul coliformilor fecali indică gradul poluării fecale a apei și demonstrează, indirect, pericolul epidemiologic în ce privește agenții patogeni ai infecțiilor intestinale.

Escherichia coli este un indicator suplimentar, care demonstrează o poluare fecală recentă. Se izolează în bulion biliat cu lactoză și acid boric sau bulion biliat cu verde briliant și lactoză. Drept *E. coli* considerăm bacteriile lactozopozitive, care degradează lactoza cu formare de acid și gaz la temperatura de $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ în prezența inhibitorilor florei de asociație și produc indol la aceeași temperatură.

Tabelul 57.1. Determinarea coliformilor per litru de apă potabilă furnizată centralizat

Numărul rezultatelor pozitive din 3 volume, ml			Indicele coli	Titrul coli
100	10	1		
0	0	0	<3	>333
0	0	1	3	333
0	1	0	3	333
1	0	0	4	250
1	0	1	7	143
1	1	0	7	143
1	1	1	11	91
1	2	0	11	91
2	0	0	9	111
2	0	1	14	72
2	1	0	15	67
2	1	1	20	50
2	2	0	21	48
2	2	1	28	86
3	0	0	23	43
3	0	1	39	26

Tabelul 57.2. Determinarea coliformilor per litru de apă la etapele de epurare

Volumul de apă examinată, ml				Indicele coli	Titrul coli
100	10	1	0,1		
—	—	—	—	<9	>111
—	—	+	—	9	111
—	+	—	—	10	105
+	—	—	—	23	43
+	—	+	—	94	10
+	+	—	—	230	4
+	+	—	+	960	1
+	+	+	—	2380	0,4
+	+	+	+	>2380	<0,4

57.2.4. Determinarea enterococilor

Enterococii sunt considerați ca un indicator microbiologic al unei impurificări fecale recente. Ei pătrund în mediul ambiant cu fecalele omului, animalelor sau păsărilor și sunt

mai rezistenți, în comparație cu coliformii, la acțiunea temperaturii și substanțelor dezinfectante. Sunt un indicator prețios în analiza apei bazinelor de înot. Dacă indicele enterococilor depășește 500, se presupune o poluare fecală recentă și rezervorul de apă este considerat nefavorabil din punct de vedere epidemiologic.

Depistarea enterococilor se efectuează prin metoda membranelor filtrante sau, în cazul unei impurificări masive, a titrării.

57.2.4.1. Metoda membranelor filtrante

Volumul de apă care trebuie filtrat se stabilește în raport cu gradul prezumtiv de impurificare. După filtrare, uzuală, se transferă membranele filtrante pe o placă cu mediu Slanetz-Bartley (geloză cu extract de levură, glucoză, azid de sodiu, clorură de trifeniltetrazoliu), care este incubată 24 ore la 37°C. Pe acest mediu enterococii formează colonii mici, bombate, rotunde, de culoare vișinie-închis. Identificarea se face pe baza caracterelor morfotinctoriale și prin testarea catalazei. Pentru determinarea catalazei se depune pe suprafața coloniei o picătură din soluția 3% de peroxid de hidrogen. Apariția bulelor indică producerea de către bacterii a catalazei și asemenea colonii nu se iau în considerație. Enterococii sunt catalazonegativi. Indicele enterococilor se calculează după formula:

$$\frac{\text{număr colonii de enterococi}}{\text{volum de apă filtrat}} \times 1000.$$

57.2.4.2. Metoda de titrare

Se însămânțează diferite volume de apă în mediul de îmbogățire cu repicare ulterioară pe mediu solid selectiv, pentru a obține colonii izolate, care se identifică și se determină indicele.

Se însămânțează volume de 100 și 10 ml apă, în 100 ml și, respectiv, 10 ml mediu de îmbogățire dublu concentrat (bulion peptonat alcalin cu glucoză, extract de levură, polimixină, albastru de bromtimol), iar volumele de 1 ml ale diluțiilor se însămânțează în 5 ml de mediu cu concentrație obișnuită. Se incubează probele însămânțate 24 ore la 37°C. În etapa a doua se repică toate probele pozitive (turbiditate, virajul culorii în galben) în sectoare pe plăci Petri cu mediu selectiv (geloză cu lapte, cristal violet și telurit de potasiu).

După 24 ore de incubare la 37°C, se verifică microscopic, pe frotiu colorat Gram, coloniile negre, bombate, cu luciu metalic și se stabilește indicele enterococilor consultând tabelele standard.

57.2.5. Determinarea stafilococilor

Acest indicator microbiologic este necesar la analiza apei în zonele de recreație și bazinele de înot. Depistarea a mai puțin de 100 stafilococi/ml indică o calitate necorespunzătoare a apei.

Stafilococii pot fi depistați prin metoda membranelor filtrante, însămânțare directă sau prin titrare.

57.2.5.1. Metoda membranelor filtrante

Se filtrează 50 ml apă prin 2—3 membrane, care se transferă apoi pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou. Se incubează plăcile 24 ore la 37°C. Se numără coloniile bombate, lucioase cu o zonă de opacifiere. Identitatea stafilococilor se confirmă prin microscopia frotiului din coloniile suspecte colorat Gram, testarea lecitinazei și coagulazei. Indicele stafilococilor se calculează după formula indicată mai sus pentru enterococi.

57.2.5.2. Insămânțarea directă

Se insămânțează câte 0,5 ml în 2 cutii sau câte 0,2 ml în 5 cutii Petri cu geloză hiperclorurată cu lapte și ou. După incubare, se numără coloniile suspecte, se identifică și se stabilește indicele stafilococilor ținând cont de volumul de apă insămânțat.

57.2.5.3. Metoda de titrare

În metoda de titrare se insămânțează 10; 1; 0,1 ml apă în mediul de îmbogățire (bulion peptonat cu 10% clorură de sodiu). După 48 ore de incubare la 37°C se fac repicări pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou, pentru identificarea ulterioară uzuală a stafilococilor. Indicele și titrul stafilococilor se calculează folosind tabelele standard.

57.2.6. Izolarea microflorei patogene

Analiza microbiologică sanitară a apei pentru depistarea microflorei patogene se face, de regulă, numai la indicații epidemiologice. Aceste examinări sunt justificate în următoarele circumstanțe:

- când indicele coli al apei potabile nu corespunde exigenței standardelor de stat;
- când se selectează surse de aprovizionare centralizată cu apă;
- în zonele de recreație;
- la construcția stațiunilor balneare, caselor de odihnă, instituțiilor de copii;
- pentru aprecierea eficienței instalațiilor de epurare a apelor reziduale.

Probele necesare sunt: 1—3 litri apă potabilă, 1 litru din bazinele deschise, 100 ml apă reziduală, 1—20 g sediment al apelor reziduale. Din bazinele deschise se recoltează probe în locurile stagnante, de la suprafață și de la adâncimea de 50—100 cm.

57.2.6.1. Depistarea salmonelelor

Din apa potabilă și din bazine deschise se insămânțează volume de 200 ml în medii de îmbogățire (e.g. bulion cu selenit, bulion tetratrat cu verde brillant, mediu cu magneziu). După incubare de 24 ore la 37°C, din fiecare flacon se fac repicări pe plăci cu mediul bismut-sulfid, care sunt incubate 48 ore la 37°C. Coloniile suspecte (rotunde, negre, lucioase) se repică, pentru triajul biochimic, în mediul Olkenișki cu incubare de 24 ore la 37°C. Salmonelele acidifiază coloana mediului (fermentează glucoza) fără a modifica panta (nu fermentează lactoza și zaharoza și nu hidrolizează ureea). Se identifică culturile izolate după caracterele biochimice și serologice.

57.2.6.2. Depistarea shigelelor

Se însămânțează 400 ml apă în 100 ml mediu de îmbogățire (bulion cu selenit sau, mai bine, bulion alcalin Hajna pentru îmbogățirea bacililor gramnegativi). După 24 ore de incubare la 37°C se repică fiecare probă pe câte 5 plăci cu mediu Levine sau Ploskirev, care sunt incubate 24—48 ore la 37°C. Coloniile suspecte, incolore, se repică în mediul Olkenițki, care indică, după 24 ore de incubare la 37°C, numai fermentarea glucozei (acidifierea coloanei). Izolatele sugestive se identifică biochimic (fermentarea glucidelor, producerea indolului, hidrogenului sulfurat ș.a.) și antigenic (reacții de aglutinare pe lamă, inițial cu seruri polivalente, apoi, dacă reacția este pozitivă, cu fiecare ser din amestec).

Serovarurile și subserovarurile se determină cu seruri specifice adsorbite. Pentru determinarea biovarurilor *Sh. sonnei* se însămânțează cultura izolată în medii cu xiloză și ramnoză.

57.2.6.3. Depistarea vibrionilor holerici

Se recoltează probe de 1—2 litri de apă potabilă sau din bazinele deschise, 0,5 litri din ape reziduale și 200 ml depuneri de la fundul rezervorului de apă. Probele marcate se introduc în containere metalice (casolette, cratițe, căldări) și se expediază prin curier special.

Izolarea vibrionilor poate fi efectuată prin metoda membranelor filtrante sau prin însămânțare în medii de îmbogățire. La început se stabilește pH-ul apei, care trebuie alcalinizată cu soluție 10% hidroxid de sodiu până la pH 8,0, apoi se toarnă proba în două recipiente cu volumul de până la 1 litru, în care se adaugă soluție 10% de peptonă, pentru a obține apă peptonată 1% alcalină, mediu electiv pentru vibrionii holerici. După incubare 5 ore la 37°C, pe suprafața mediului apare o peliculă fină azurie, care trebuie repicată în a doua apă peptonată și pe geloză alcalină.

Microscopia pe preparat umed între lamă și lamelă (controlează mobilitatea) și pe frotiu colorat Gram, urmate de reacția de aglutinare pe lamă cu serul specific anti-O:1, permit obținerea unui rezultat preliminar. După încă 5—6 ore coloniile suspecte de pe geloză alcalină, care aglutinează cu serul anti-O:1, se repică pe geloză cu lactoză și zaharoză. Citirea rezultatelor se face după 16—18 ore de termostatare. Vibrionii fermentează zaharoza (acidifierea coloanei). Identificarea definitivă a culturii izolate se face prin testele cunoscute.

57.2.6.4. Depistarea leptospirelor

Pentru depistarea leptospirelor se examinează mai frecvent apa din iazuri, lacuri mici, fluvii, care servesc atât pentru scăldat, cât și pentru adăparea animalelor. Se recoltează minimum 300 ml apă, nămolul de la fund și nisipul. Examinarea se face prin metoda microscopiei directe, bacteriologică și biologică.

Microscopia. Din proba de apă centrifugată sau filtrată prin membrane filtrante se pregătesc cel puțin 10 preparate între lamă și lamelă, care se examinează la microscopul cu fond întunecat.

În metoda bacteriologică se însămânțează sedimentul după centrifugare în mediul Vervoort-Wolff (apă sterilă de robinet cu ser de iepure inactivat la 56°C timp de 30 minute) și se incubează cultura 10—15 zile la 28—30°C. Pentru a urmări creșterea leptospirelor, se efectuează preparate între lamă și lamelă de la fundul eprubetei și se examinează la microscopul cu fond întunecat (mediul rămâne transparent). Identificarea leptospirelor se face prin reacția de aglutinare-liză (RAL) cu seruri specifice. Reacția se menține 2 ore în termostat la 30°C. Pe preparatele între lamă și lamelă observăm la început aglutinarea leptospirelor cu aspect de păianjen, apoi se pierde mobilitatea și leptospirele se dezin-tegrează în formațiuni granulare.

Metoda biologică constă în infectarea percutană a cobailor cu pielea de pe abdomen și flancuri epilată și scarificată. Se mențin animalele astfel pregătire timp de 2 ore în apa de examinat încălzită la 30°C. Dacă apa conține leptospire, animalele se îmbolnăvesc după 5—11 zile: temperatura se ridică până la 40—41°C, apare icterul sclerei, membranelor mucoase și a pielii. Sângele și organele animalelor decedate sau sacrificate îl însămânțăm în mediul Vervoort-Wolff, pentru a obține cultura pură de leptospire.

57.3. APRECIEREA CALITĂȚII APEI DUPĂ INDICATORII BACTERIOLOGICI

În raport cu prevederile standardelor de stat, apa de robinet urmează să conțină cel mult 100 microorganisme/ml, indicele coli să fie de cel mult 3 și titrul coli mai mare de 333. Apa bazinelor de înot trebuie să corespundă aceluiași exigențe ca și apa de robinet; titrul enterococilor să fie de cel puțin 10, iar stafilococi se admit până la 20 UFC/litru.

Pentru apa potabilă din fântâni, izvoare este stabilit indicele coli până la 10 și titrul coli de cel puțin 100.

În apa din sursele de alimentare preconizate pentru o aprovizionare centrală cu clorinare se admite un titru coli de cel puțin 1 și indicele coli de cel mult 1000. Dacă aceeași sursă se preconizează a fi utilizată după o epurare completă și clorinare, titrul coli se cere să fie mai mare de 0,1 și indicele coli mai mic de 10 000.

Indicele stafilococilor în zonele de recreație nu trebuie să depășească 100.

Apa bazinelor care conține enterococi și *E. coli* mai mult de 1000/ litru este considerată impurificată și periculoasă din punct de vedere epidemiologic.

Sursele de apă nu trebuie să conțină floră patogenă.

EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL SOLULUI

58.1. DATE GENERALE

Analiza microbiologică sanitară a solului ne permite să-i apreciem starea sanitaro-epidemiologică, pentru a elabora măsuri igienice orientate spre ocrotirea sănătății populației. Examenul microbiologic al solului are ca obiective:

- alegerea terenurilor pentru construcția locuințelor, a instituțiilor de copii (creșce, grădinițe, școli, tabere de odihnă);
 - rezolvarea problemei de aprovizionare cu apă și canalizare a localităților;
 - controlul capacității de autoepurare a solului;
 - precizări privind implicarea posibilă a solului în transmiterea unor boli infecțioase;
 - determinarea duratei de supraviețuire a microorganismelor patogene în sol;
 - aprecierea sanitară a plajelor și locurilor de odihnă colectivă;
 - supravegherea grădinilor de zarzavaturi irigate cu ape impurificate de suprafață.
- Analiza microbiologică sanitară a solului se face curent sau preventiv.

Controlul sanitar curent include următorii *indicatori microbiologici minimali*:

- a) determinarea coliformilor;
- b) determinarea numărului total de bacterii;
- c) titrul *C.perfringens*;
- d) bacteriile termofile;
- e) bacteriile nitrificante (tabelul 58.1).

Tabelul 58.1. Calitatea solului în raport cu principalii indicatori bacteriologici

Solul	Titrul		NTM	Microorganismele termofile/g
	coliformilor	perfringens		
Curat	>10	>0,01	<10 000	100—1000
Poluat	0,9—0,01	0,009—0,0001	100 000 — 1 000 000	1000 —100 000
Masiv poluat	<0,009	<0,00009	1 000 000	100 000— 4 000 000

Controlul sanitar preventiv presupune o analiză completă care include:

- a) toate testele minimale curente;

- b) numărul și procentul sporilor;
- c) cantitatea actinomicetelor și fungilor;
- d) microorganismele capabile să descompună celuloza;
- e) microorganismele de amonificare;
- f) toxicitatea solului pentru microorganisme.

La indicații epidemiologice se determină prezența microorganismelor patogene: salmonelle și shigele, bacilii tetanic, botulinic și al antraxului.

58.2. EFECTUAREA ANALIZEI

58.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor

Recoltarea corectă a probelor impune descrierea localității cu precizări privind: caracterul reliefului, vegetația, climatul, dimensiunile teritoriului examinat, informații despre prezența sau lipsa canalizării, distanța de la sursele de impurificare. Pe arii de până la 1000 m^2 se selectează două sectoare cu suprafața de 25 m^2 : unul mai aproape de sursa de impurificare, iar altul (de control) la o anumită depărtare.

Recoltarea solului se face cu linguri sau spatule metalice sterilizate. Din profunzimea solului se recoltează probe cu ajutorul unor dispozitive speciale. Probele de $200\text{--}300\text{ g}$ se introduc în borcane de sticlă cu dop șlefuit sau în pungi de polietilenă neutră. Probele de sol recoltate din 5 puncte amplasate pe diagonala sectorului sau în colțuri și centrul lui (regula plicului), se amestecă într-un vas steril, pentru a obține o probă medie de cel puțin 1 kg . Proba, însoțită de o fișă în care este indicată data, ora și locul recoltării, trebuie transportată imediat la laborator și conservată la $+4^{\circ}\text{C}$. Însămânțarea, în aceste condiții, se poate temporiza cel mult 24 ore.

58.2.2. Pregătirea probei pentru analiză

Din proba de sol se îndepărtează corpii de dimensiuni mari ca pietricele, rădăcini, bucăți de sticlă, frunze ș.a. După fărâmițarea și omogenizarea probei într-un mojar steril, se cântăresc 30 g , care se introduc într-un balon cu dop șlefuit, ce conține perle de sticlă și 270 ml apă de robinet sterilă. Prin agitare îngrijită, timp de 10 minute, se obține diluția inițială 10^{-1} , din care se pregătesc apoi diluții succesive decimale. Din diluția 10^{-1} , cu o pipetă sterilă, se transferă 1 ml într-o eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă (diluția 10^{-2}), apoi cu altă pipetă sterilă se transferă 1 ml din diluția 10^{-2} în altă eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă (diluția 10^{-3}) etc. Când se analizează un sol curat sunt suficiente diluții până la 10^{-3} — 10^{-4} , însă pentru solul impurificat sunt necesare diluții până la cel puțin 10^{-6} .

58.2.3. Determinarea numărului total de bacterii

Se însămânțează câte 1 ml din fiecare diluție, bine omogenizată, paralel în două cutii Petri, în care se toarnă imediat câte $7\text{--}10\text{ ml}$ geloză topită și răcită la 45°C . Se amestecă bine geloză cu suspensia de sol prin rotații și, după solidificare, incubăm plăcile 24 ore la $28\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Pentru numărare se aleg diluțiile din care au crescut $50\text{--}150$ colonii/placă. Dacă au crescut mai mult de 150 colonii, se numără coloniile de pe $1/4$ din suprafața plăcii

cu recalcularea pentru toată suprafața. Se determină media aritmetică a coloniilor dezvoltate pe cele două plăci, apoi se calculează numărul coloniilor ce revin la 1 g sol luând în considerație diluția.

Importanța sanitară a numărului total de germeni saprofiți trebuie apreciată numai în coroborare cu alți indicatori microbiologici și cu particularitățile solului examinat.

58.2.4. Determinarea coliformilor

Pentru determinarea poluării fecale a solului se utilizează diferite metode de detectare a coliformilor: de titrare, metoda membranelor filtrante sau însămânțarea directă.

■ *Metoda de titrare.* Din diluțiile pregătite se însămânțează flacoane și eprubete cu mediul Kessler. Din diluția 10^{-1} se însămânțează, cu o pipetă sterilă, 10 ml într-un flacon cu 50 ml mediu, ceea ce corespunde la 1 g sol. Din restul diluțiilor se însămânțează câte 1 ml în eprubete cu 9 ml mediu. Se termostatează însămânțările 48 ore la 37°C . Dacă în mediile însămânțate nu se observă turbiditate și producerea gazului, se formulează un răspuns negativ. Dacă apare turbiditatea mediilor sau turbiditate și gaz, atunci se fac repicări pe plăci cu mediul Endo sau cu geloză rozolică (geloză nutritivă cu bilă, lactoză, acid rozolic, albastru de bromtimol), cu incubare 24 ore la 37°C . Lipsa creșterii pe mediile de repicare permite formularea unui răspuns negativ. Dacă cresc colonii tipice pentru coliformi (roșii sau roz cu luciu metalic pe mediul Endo, galbene sau oranj pe mediul rozolic), se verifică microscopic pe frotiuri colorate Gram, se controlează activitatea oxidazică, apoi, pentru confirmare, se însămânțează pe mediul semilichid glucozat cu incubare 24 ore la 37°C . Apariția acidului și gazului confirmă prezența coliformilor. Rezultatul se exprimă în indice coli, adică numărul coliformilor ce revin la 1 g de sol.

■ *Metoda membranelor filtrante.* Este o metodă rapidă utilizată frecvent în cazul analizei unui sol mai puțin poluat. Se centrifugează diluția 10^{-1} a suspensiei de sol timp de 5 minute la 2000 rpm pentru sedimentarea particulelor mai mari. Apoi se filtrează 5—10 ml din supernatant prin membrane filtrante N3. Analiza ulterioară se efectuează identic cu analiza apei, pentru a calcula numărul de colonii la 1 g sol.

■ *Însămânțarea directă.* Din solul locurilor cu impurificare fecală masivă se însămânțează câte 0,1 ml din diluțiile de la 10^{-1} până la 10^{-6} pe plăci cu mediul Endo. După incubare 24 ore la 37°C , se numără coloniile tipice pentru coliformi. Identificarea se efectuează prin testele uzuale. Rezultatele le exprimăm în titrul coli sau indicele coli.

58.2.5. Determinarea *C.perfringens*

Depistarea în sol a *C.perfringens* indică o impurificare fecală și, indirect, prezența în sol și a unor clostridii patogene cum sunt: *C.tetani*, *C.botulinum*, care ajung în sol de asemenea cu materiile fecale ale omului și animalelor. Decelarea germenilor sulfitoreducători se poate efectua prin diferite metode.

■ *În mediul Wilson-Blaire.* Din diluțiile de sol de la 10^{-1} până la 10^{-6} se pipetează câte 1 ml în două rânduri de eprubete sterile. Unul din aceste rânduri se încălzește 15 minute la 80°C , pentru distrugerea formelor vegetative. Apoi, în fiecare eprubetă din ambele rânduri, se pipetează câte 9—10 ml de mediu Wilson-Blaire, se omogenizează conținutul, prin rularea eprubetelor între palme, și se răcesc brusc eprubetele în apă rece. Urmează o incubare de 24 ore la 43°C . În prezența *C.perfringens* apar, chiar după 2—3 ore, colonii negre și rupturi în mediu din cauza producerii de gaz. Pe frotiurile pregătite din colonii depistăm bastonașe caracteristice grampozitive.

■ *Metoda Sidorenko-Pivovarov* utilizează mediul sulfit-polimixină-neomicină (SPN).

Antibioticele din mediu inhibă flora asociată. Coloniile negre, care apar după incubarea culturii la 44—45°C, nu mai trebuie identificate. Analiza durează 10—12 ore.

■ *In medii de îmbogățire* (e.g. în eprubete cu mediul Kitt-Tarozzi regenerat în prealabil prin fierbere) se însămânțează câte 1 ml din diluțiile încălzite și din cele native. După o incubare de 18—20 ore la 37°C, se repică câte 0,5—1,0 ml din eprubetele cu turbiditate în mediul Wilson-Blaire sau SPN, urmărind creșterea ca în metodele descrise mai sus.

58.2.6. Determinarea microorganismelor termofile

Temperatura optimă pentru cultivarea microorganismelor termofile este de 58—60°C. Microorganismele termofile nu sunt caracteristice solurilor poluate. Solul care conține mulți coliformi și puține microorganisme termofile este considerat poluat cu materii fecale, din cauză că microflora intestinală a omului și animalelor este foarte săracă în termofili. Termofili sunt reprezentați de bacili grampozitivi sporulați și actinomicete care se multiplică activ în composturi și gunoi. De aceea depistarea unei concentrații sporite de coliformi și termofili indică îngrășarea solului cu gunoi de grajd (băligar) sau composturi. Pentru depistarea microorganismelor termofile, se însămânțează diluțiile suspensiilor de sol (de la 10^{-1} până la 10^{-6}) paralel pe 2—3 plăci cu geloză turnată în strat mai gros. Se incubează apoi plăcile 24 ore la 60°C, se numără coloniile și se calculează câte UFC revin la 1 g de sol.

58.2.7. Determinarea microorganismelor patogene

Solul este poluat, de regulă, cu excrețiile omului și animalelor, cu diverse deșuri menajere o dată cu care pot pătrunde și microorganisme patogene. Din sol microbii pătrund în bazinele acvatice, contaminează legumele, fructele, produsele alimentare, alte elemente de mediu. Solul joacă un rol considerabil în cazul tetanosului, infecției anaerobe gazoase, botulismului, precum și în transmiterea antraxului, leptospirozelor, toxiinfecțiilor alimentare, febrei tifoide, dizenteriei ș.a.

58.2.7.1. Determinarea salmonelilor și shigelelor

Solul poate fi contaminat cu salmonelle în urma poluării cu materii fecale, mai ales ale animalelor la care salmonellele sunt comensale sau determină infecții acute. Shigelele pătrund în sol cu materiile fecale ale omului. Pentru depistarea salmonelilor se folosesc două metode: însămânțarea în mediul de îmbogățire și coagularea cu însămânțarea ulterioară pe medii selectiv-diferențiale.

■ *Însămânțarea în mediul de îmbogățire* este o metodă mai simplă. În suspensia de sol pregătită se introduc toți componenții mediului cu magneziu (mediul «M») corespunzător cu volumul suspensiei. După incubarea de 18—20 ore la 37°C, se fac repicări pe 3—5 plăci cu mediul bismut-sulfit. Identificarea coloniilor suspecte se efectuează după metoda obișnuită pentru salmonelle.

■ *Metoda coagulării și centrifugării după Fiker*. Pentru concentrarea salmonelilor, la 500 ml suspensie de sol se adaugă 1,7 ml soluție sterilă 10% sulfat de fier și 2 ml soluție 10% bicarbonat de sodiu (mediul alcalin favorizează coagularea). Se amestecă suspensia minuțios cu coagulantul și se menține o oră la 4°C. Flacoanele de coagul sedimentează spontan împreună cu bacteriile. Centrifugăm acest sediment 5 minute la 5000 rpm. Se

decantează supernatantul și se solvă sedimentul centrifugării, adăugând, cu picătura, soluție sterilă 25% tartrat de potasiu, apoi se însămânțează câte 0,5—1,0 ml pe mediile Ploskirev și Wilson-Blair cu incubare la 37°C. Peste restul sedimentului solvit se adaugă 50 ml bulion biliat 10—20%. După 5 și 20 ore de incubare la 37°C, din bulionul biliat se fac repicări pe medii diferențiale. Izolatele suspecte a fi *Salmonella* se identifică după metoda uzuală.

Shigelele se depistează paralel, efectuând însămânțarea suspensiei de sol în mediu cu selenit și repicare ulterioară pe medii diferențiale cu identificarea coloniilor suspecte.

58.2.7.2. Determinarea *C.tetani*

Se triturează într-un mojar steril 20—30 g sol. Se amestecă apoi 3—5 g din omogenat cu 8—15 ml soluție salină izotonă și se lasă 3—4 ore, pentru a se limpezi la temperatura camerei. Se injectează subcutan câte 1 ml suspensie la 4 șoareci, dintre care doi au fost în prealabil protejați cu ser antitetanic. Moartea șoarecilor neprotejați și supraviețuirea celor de control indică prezența *C.tetani*.

În caz de necesitate, se izolează bacilul tetanic în cultură pură după metoda de izolare și identificare a anaerobilor sporulați.

58.2.7.3. Determinarea *C.botulinum*

Se mojurează aseptice două probe de 20—30 g sol, care se introduc apoi în baloane cu 80—100 ml mediu Kitt-Tarozzi. Unul din baloane se încălzește 30 minute la 80°C, pentru distrugerea florei nesporulate, apoi se incubează ambele baloane la 37°C. După 8—14 zile se fac repicări, pentru obținerea culturii pure. Toxina o depistăm prin *proba biologică*, pentru care se injectează subcutanat 6 șoareci cu câte 0,5 ml suspensie de sol după cum urmează:

- 2 șoareci cu suspensia nativă,
- 2 șoareci cu suspensia inactivată termic,
- 2 șoareci cu amestec al suspensiei native cu ser antibotulinic polivalent.

Proba este pozitivă dacă supraviețuiesc numai șoarecii la care am injectat amestecul suspensie nativă cu ser antibotulinic polivalent.

ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A NĂMOLURILOR CURATIVE

Proba de nămol, în cantitate de 15 g, prelevată cu un dispozitiv special, se introduce într-o cutie Petri sterilă. În cazul analizei unui nămol puternic mineralizat, se introduce proba de 50 g într-un balon cu 500 ml apă de robinet sterilă și perle de sticlă (diluția 10^{-1}) și se agită minuțios 15—20 minute pentru omogenizare. Din diluția de bază se pregătesc diluții decimale succesive de 10^{-2} , 10^{-3} etc., transferând succesiv câte 1 ml în eprubete cu 9 ml apă sterilă de robinet.

Analiza presupune determinarea numărului total de microorganisme, a coliformilor, *C.perfringens*, a cocilor patogeni și *C.tetani*. În tabelul 59.1 prezentăm normele sanitare pentru nămolurile curative.

Tabelul 59.1 Normele sanitare pentru nămolul curativ

Tipul nămolului	Titrul		Cocil patogeni	<i>C.tetani</i>
	<i>perfringens</i>	coliformilor		
Sapropelic	>0,1	>1	—	—
De turbă, puțin mineralizat cu pH mai mare de 5, vulcanic sau de izvor	> 0,1	> 10	—	—
Sulfidice, puternic mineralizate și de turbă cu pH mai mic de 3,6	> 0,1	> 30	—	—

Determinarea numărului total de microorganisme. Se determină, per gram de nămol, numărul total de microorganisme aérobe și facultativ anaérobe mezofile, capabile să se dezvolte pe medii de cultură la 37°C în 24 ore. Pentru aceasta se pipetează câte 1 ml din diluțiile de nămol în două cutii Petri sterile și se amestecă imediat cu geloză topită și răcită la 45°C . După incubare, se numără coloniile și se calculează numărul de germeni mezofili/g nămol, procedând ca la determinarea numărului total de bacterii/g de sol.

Determinarea coliformilor. Depistarea coliformilor în nămol indică o poluare fecală, iar cantitatea lor permite aprecierea gradului de poluare. Coliformii se determină prin metoda de fermentare și se exprimă în titru coli.

În prima etapă se însămânțează 100 ml din diluția 10^{-1} (10 g nămol) într-un flacon cu 10 ml mediu peptonat cu glucoză concentrat. Din alte diluții se însămânțează câte 1 ml

in eprubete care conțin câte 1 ml din același mediu normal concentrat. După o incubare de 24 ore la 37°C, din probele pozitive se fac repicări în sectoare, pe plăci cu mediul Endo, care sunt incubate 24 ore la 37°C. Urmează identificarea coloniilor sugestive pe baza caracterelor morfotinctoriale, testului oxidazei și repicării pe mediul semilichid cu glucoză, pentru a urmări producerea de acid și gaz. Titrul coliformilor este cantitatea minimă de nămol care conține o bacterie coliformă. E. g. dacă se înregistrează un rezultat pozitiv la diluția 10^{-1} cu lipsa creșterii la diluția 10^{-2} , atunci titrul coliformilor va fi 0,1 g.

Determinarea C.perfringens. Se însămânțează câte 1 ml din diluțiile 10^{-1} — 10^{-4} în eprubete cu lapte steril, cu incubare 48 ore la 37°C sau 24 ore la 43°C, după o încălzire de 15 minute la 80°C. În prezența *C.perfringens* în eprubete apare cheag spongios. Titrul se determină după diluția la care s-a mai format cheagul tipic. E. g. dacă ultima diluție la care s-a mai format cheagul a fost 10^{-3} , atunci titrul va fi 0,001 g, iar dacă a fost 10^{-4} , titrul va fi 0,0001 g. În cazul probelor negative la toate diluțiile, titrul va fi mai mare de 0,1 g, adică un bacil perfringens revine la mai mult nămol decât am însămânțat noi.

Determinarea cocilor patogeni. Se epuizează câte 0,2 ml din diluția de bază pe o placă cu geloză hiperclorurată cu lapte și ou și pe una cu geloză-sânge cu incubare 48 ore la 37°C. Paralel se însămânțează 1 ml din diluția de bază în bulion glucozat. După incubare, se citesc rezultatele și se identifică culturile.

Determinarea titrului C.tetani. Se însămânțează 1—5 ml din diluția inițială în 150 ml mediu Kitt-Tarozzi cu incubare 6 zile la 37°C. Se verifică pe frotiu colorat Gram caracterele morfotinctoriale ale bacteriei izolate, apoi se injectează 1,5 ml din filtratul culturii la șoareci. Dacă filtratul conține toxină tetanică, șoarecii mor cu semnele tipice ale tetanosului.

ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A AERULUI

60.1. DATE GENERALE

Analiza bacteriologică sanitară a aerului permite o apreciere igienică și epidemiologică a mediului aerian, pe baza căreia putem stabili un complex de măsuri pentru profilaxia infecțiilor aerogene, a căror pondere în patologia infecțioasă este considerabilă.

Aerul este un mediu în care microorganismele nu se multiplică din cauza lipsei nutrienților. Microorganismele care impurifică aerul provin din sol, apă, organismele vegetale, animale și uman, precum și din diverse activități ale omului. De aceea microflora aerului atmosferic și din încăperile închise diferă substanțial, atât cantitativ, cât și calitativ. În aerul atmosferic microflora este mai bogată vara și mai redusă iarna, pe când în încăperile închise iarna se depistează mai mulți microbi, inclusiv patogeni, iar vara mai puțini. O atenție deosebită se acordă studierii microflorei aerului din instituțiile de copii și unitățile sanitare.

Analiza microbiologică a aerului presupune studierea diversității speciilor microbiene, precum și cuantificarea indicatorilor microbiologici.

Aprecierea stării sanitare a aerului din încăperile închise se efectuează pe baza concentrației indicatorilor microbiologici, ca stafilococii și streptococii α - și β -hemolitici, precum și numărului total de microorganisme per m^3 de aer.

În clinicile chirurgicale, maternități și în alte instituții medicale se determină flora potențial patogenă, care cauzează deseori infecții nozocomiale (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus* ș. a.). Se examinează aerul în sălile de operații, saloanele postoperatorii, sălile de pansament, secțiile de reanimare, sălile de naștere, saloanele postnatale, în grădinițele de copii, creșe, școli, policlinici, farmacii, precum și în locurile de concentrare în masă a populației cum ar fi cazărmi, cinematografe, săli de sport etc. În tabelele 60.1 și 60.2 prezentăm criteriile microbiologice de apreciere a aerului din încăperi și din instituții curative.

Tabela 60.1. Criterii de apreciere a aerului din încăperi

Indicatorii	Vara		Iarna	
	curat	impurificat	curat	impurificat
NTM la $1 m^3$	≤ 1500	≥ 2500	≤ 4500	≥ 7000
Streptococi la $1 m^3$	<16	<36	<36	<124

Tabelul 60.2. Aprecierea aerului în instituțiile curative

Obiectul	Condițiile de activitate	NTM la 1 m ³	Concentrația admisă la 1 m ³	
			stafilococi patogeni	streptococi
Sală de operații	Până la operație După operație	<500 <1000	— —	— —
Saloane postoperatorii		<750	—	—
Secție de reanimare		<750	—	—
Sală de naștere	La începutul travaliului	<1500	—	—
Saloane postnatale		<2000	Până la 16 în total	
Saloane pentru nou-născuți		<1500	Până la 12 în total	
Sală de pansament	Până la lucru	<750	—	—
Salon de spital	Vara Iarna	<3500 <5000	<24 <52	<16 <36

60.2. EFECTUAREA ANALIZEI

60.2.1. Recoltarea probelor

Pentru analiza microbiologică a aerului din încăperi închise se prelevă probe la fiecare 20 m² de suprafață, din 5 puncte (4 puncte la colțuri și în centru) situate la 0,5 m de la pereți și la o înălțime de 1,6—1,8 m de la podea (nivelul respirației în încăperile de locuit), și la nivelul patului în saloanele de spital. Recoltarea se face ziua în perioada activității intensive a omului și după curățenia umedă și ventilarea încăperii.

Aerul atmosferic din zonele de locuit se recoltează de la o înălțime de 0,5—2 m de la sol, în apropierea surselor de impurificare, precum și în zonele verzi (parcuri, grădini etc.).

Probele de aer pot fi recoltate prin metoda de sedimentare sau de aspirație.

■ *Metoda de sedimentare*, deși mai puțin exactă, este încă destul de frecvent aplicată, din cauză că este simplă și accesibilă. Metoda a fost propusă de Robert Koch și constă în capacitatea microorganismelor de a se sedimenta pe suprafața mediului de cultură în cutia Petri deschisă. Sedimentarea se face atât gravitațional, cât și sub influența mișcării aerului împreună cu particulele de praf și picăturile de aerosoli. Cutiile trebuie plasate orizontal în punctele de recoltare. Pentru determinarea numărului total de germeni se folosesc cutii cu geloză obișnuită, pentru stafilococi geloză hiperclorurată cu lapte sau cu lapte și ou, iar pentru streptococi mediul Garro (geloză cu sânge defibrinat de iepure și violet de gențiană). Pentru depistarea microorganismelor patogene se utilizează medii speciale corespunzătoare. Metoda de sedimentare are mai multe dezavantaje: sedimentează numai fracțiunile

macrodisperse ale aerosolului, deseori coloniile se formează din aglomerații de celule și nu din celule aparte, pe medii cresc numai o parte din microorganismele microflorei aerului. Metoda nu este utilă pentru analiza aerului atmosferic.

■ *Metoda de aspirație* este mai avantajoasă. În această metodă are loc sedimentarea forțată a microorganismelor din aer pe suprafața mediului de cultură sau în lichidul de captare (bulion peptonat, soluție tampon, soluție salină izotonă ș. a.). Pentru aceasta se folosesc aparatul Krotov, captatorul Recimenski, diverse dispozitive propuse de Kiktenko, Diakonov, Andersen ș. a. Pentru examinarea aerului atmosferic pot fi utilizate și membranele filtrante N4, prin care aerul se aspiră cu ajutorul aparatului Seitz.

Aparatul Krotov se folosește pentru analiza aerului din încăperile închise. Principiul de funcționare: aerul aspirat printr-o fantă din capacul aparatului se lovește de suprafața mediului de cultură, iar particulele de praf și aerosoli se lipsesc de mediu și o dată cu ele microorganismele pe care le vehiculează. Cutia Petri cu mediul de cultură se montează pe măsura rotativă a aparatului, ceea ce asigură repartizarea uniformă a bacteriilor pe suprafața mediului. Probele se recoltează cu o viteză de 20—25 litri/minut timp de 5 minute. Pentru depistarea indicatorilor microbiologici, se recoltează probe de aer de până la 250 litri.

Captatorul Recimenski constă dintr-un cilindru cavitat din sticlă în interiorul căruia este sudată o pâlnie cu un capilar care comunică cu rezervorul. Înainte de recoltarea probei, se introduce în rezervor 3—5 ml lichid de captare. Aparatul Recimenski lucrează după principiul pulverizatorului: la trecerea aerului prin orificiul îngust din pâlnie, lichidul din rezervor se ridică prin capilar în cilindru sub formă de picături. Picăturile de lichid se pulverizează prin impactul cu pereții vasului și cu lopățile de sticlă. Așa se formează un noruș de picături mici, pe care se adsorb microorganismele din aer. Picăturile de lichid saturate cu bacterii se scurg în rezervor, apoi, din nou, sunt dispersate, ceea ce asigură o captare maximă a bacteriilor. Aparatul trebuie să funcționeze sub un unghi de 15—20°, pentru ca lichidul să se scurgă în rezervor. Viteza recoltării probelor este de 10—20 litri/minut. După recoltare, 0,2 ml de lichid aspirat din rezervor, cu o pipetă sterilă, se epuizează pe suprafața mediului de cultură adecvat.

Aparatul Diakonov asigură foarte simplu captarea bacteriilor în lichid. Este un cilindru din sticlă în care, prin dop, trec 2 tuburi, dintre care unul se termină sub dop, iar al doilea se montează până la fundul cilindrului, unde pătrunde aerul aspirat. În cilindru se toarnă soluție salină izotonă sau apă de robinet sterilă prin care se aspiră un anumit volum de aer. La fundul dispozitivului se introduc perle din sticlă, pentru a micșora dimensiunile bulelor de aer și totodată pentru a mări suprafața de contact a aerului cu lichidul. După aspirație, se însămânțează 0,1—0,2 ml de lichid pe geloză sau 0,3—0,5 ml pe mediile selective.

Când se presupune o concentrație mică a bacteriilor în aer sau când se urmăresc bacterii patogene și potențial patogene, se filtrează lichidul de captare prin membrane filtrante N2 sau N3, care sunt însămânțate ulterior pe geloză sau pe medii selective.

Membranele filtrante. Mai frecvent se utilizează membrane filtrante din nitroceluloză. În prealabil se fierb de două ori, câte 20 minute în apă distilată, după care se usucă, aseptice, la 37° în cutii Petri între două straturi de hârtie de filtru. Astfel pregătite, membranele filtrante sunt montate în aparatul Seitz și se aspiră aerul cu aspiratorul. După recoltarea probei, se transferă membranele filtrante pe suprafața mediului de cultură solid. Membranele trebuie să fie uscate, deoarece în stare umedă prin ele nu trece aerul.

60.2.2. Determinarea numărului total de bacterii saprofite

Numărul total de microorganismе se determină la 1 m³ de aer. Cel mai frecvent se recoltează cu aparatul Krotov două probe a 100 litri aer în cutii Petri cu geloză, care sunt incubate 24 ore la 37°C și 48 ore la temperatura camerei. Numărul coloniilor per cutie trebuie să nu fie mai mare de 200—250. Se numără coloniile de pe ambele cutii și se calculează media aritmetică, după care se face recalcularea pentru 1 m³ de aer. Coloniile se studiază cu ajutorul lupei. Putem diferenția mai multe tipuri de colonii:

- coloniile bacililor sporogeni: mari, rotunde, cu margini dantelate, uscate, rugoase;
- coloniile pigmentate (galbene, albe, oranj, negre, albastre-verzui etc.) pot fi urmărite mai ușor după menținerea culturilor la lumină;
- coloniile fungilor cu suprafață pufoasă (*Mucor* și *Aspergillus*), cu suprafață compactă verzuie sau albă-cenușie (*Penicillium*);
- coloniile de actinomicete: alburii, incastrate în geloză.

Numărul fiecărei grupe de colonii se exprimă în procente față de numărul total.

Când se utilizează metoda de sedimentare după Koch, se apelează la calculele lui V. Omelianski, care a constatat că pe suprafața cutiei de 100 cm² se sedimentează în 5 minute cantitatea de microbi conținută în 10 litri de aer.

60.2.3. Determinarea stafilococilor

Stafilococii sunt relativ rezistenți la diverși factori ai mediului și sunt foarte răspândiți în aerul din încăperile închise. Depistarea stafilococilor patogeni în aer indică o situație epidemiologică nefavorabilă.

Se prelevă, cu aparatul Krotov, probe de aer în volum de 250 litri pe 2—3 cutii cu geloză hiperclorurată cu lapte sau cu lapte și ou și cu geloză-sânge, care sunt incubate 48 ore la 37°C. Stafilococii patogeni formează colonii cu diametrul de 2—3 mm, inconjurate cu o zonă de hemoliză clară. Pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou coloniile sunt inconjurate de o zonă transparentă cu un halou opac. Se verifică microscopic, pe frotiu colorat Gram, coloniile suspecte, apoi se repică pe geloză înclinată. După 24 ore de incubare la 37°C, se testează coagulaza prin repicarea culturii pure într-o eprubetă cu 0,5 ml de plasmă citratată și diluată 1:4. Stafilococii patogeni coagulează plasma în 2—24 ore, formând un coagul gelatinos la fundul eprubetei. Se calculează numărul UFC de stafilococi la 1 m³ de aer.

Pentru determinarea sursei și căilor de răspândire a infecției, trebuie efectuat fagotipajul culturii izolate.

60.2.4. Determinarea streptococilor

Aerul se poluează cu streptococii eliminați de bolnavii cu scarlatină, amigdalite, piodermite, precum și de purtători. Alături de stafilococi ei sunt indicatori microbiologici. Pentru depistarea streptococilor se recoltează, cu ajutorul aparatului Krotov, 200—250 litri de aer în cutii Petri cu geloză-sânge sau cu mediul Garro, care sunt incubate 18—24 ore la 37°C, apoi 48 ore la temperatura camerei. Pe geloză-sânge streptococii formează colonii mici, punctiforme, albe-cenușii, β -hemolitice sau α -hemolitice. Mai eficient este mediul Garro, pe care microflora asociată este inhibată prin violetul de gențiană.

Se numără coloniile suspecte și se repică în bulion glucozat pentru acumularea de cultură pură necesară identificării. În bulion streptococii cresc la fundul și pe pereții eprubetei, iar mediul rămâne transparent. Identificarea culturii pure se face pe baza testelor cunoscute: coci grampozitivi dispuși în lanțuri, catalazonegativi etc.

60.2.5. Determinarea microorganismelor patogene

Depistarea microbilor patogeni în aer este mai dificilă din cauza concentrației lor relativ mici. Sunt căutați la indicații epidemiologice (izbucniri de infecții respiratorii, nozocomiale) sau pentru a aprecia starea sanitară a saloanelor de spital ori eficiența dezinfecției aerului. La investigarea infecțiilor nozocomiale, se determină prezența în aer a stafilococilor, streptococilor, pseudomonadelor, klebsiелеlor, proteilor ș.a.

Se prelevă probe de aer cu volum de cel puțin 1000 litri, iar însămânțările se fac pe mediile de cultură selective corespunzătoare patogenilor urmăriți. Dacă sunt utilizate aparate cu lichid de captare, după prelevare se mențin 24 ore în termostat, pentru multiplicarea bacteriilor, și apoi se fac repicări pe medii selective.

Pentru depistarea micobacteriilor, ca lichid de captare se utilizează mediul Șkolnikov, care apoi se tratează cu soluție 3% de acid sulfuric și se centrifughează. Sedimentul neutralizat se însămânțează pe mediul Lowenstein-Jensen, Popescu sau Finn, cu incubare la 37°C timp de 3 luni. Se examinează eprubetele însămânțate după 3 săptămâni, după care la fiecare 10 zile. Cultura pură obținută se identifică pe baza caracterelor morfotintoriale și a testelor uzuale.

Bacilii difterici sunt depistați folosind mediul Clauberg ș.a.

În ultimii ani se acordă o atenție deosebită depistării salmonelelor în aerul din staționare în cazul izbucnirilor nozocomiale de salmoneloză. Este dovedită circulația biovarurilor spitalicești de *Salmonella* prin aer, praf, obiecte de uz curent. Probele de aer pentru depistarea salmonelelor se recoltează atât prin metoda de sedimentare, cât și de aspirație pe mediul cu bismut-sulfit. În metoda de sedimentare se mențin cutiile în saloane de la 30 minute până la 3—4 ore. Cu aparatul Krotov se examinează 100—200 litri de aer.

MICROBIOLOGIA PRODUSELOR ALIMENTARE

Produsele alimentare conțin o cantitate mare de nutrienți și sunt un mediu foarte favorabil pentru supraviețuirea și multiplicarea diverselor specii microbiene. Flora microbiană a produselor alimentare se împarte în specifică și nespecifică.

■ *Microflora specifică sau folositoare* este flora normală a produsului alimentar, reprezentată de anumite specii microbiene folosite pentru prepararea unuia sau altuia din alimente. Această floră se adaugă special, pentru a da produsului anumite calități gustative și nutritive și fără ea nu poate exista însuși produsul. E. g. nu se poate produce bere fără participarea drojdiilor, nu se pregătește chefirul, iaurtul fără bacterii acidolactice.

Microflora specifică prezintă interes în special pentru bacteriologii din întreprinderile industriei alimentare. Ei sunt datori să controleze puritatea tulpinilor microbiene respective, să studieze sistematic dacă tulpinile nu și-au modificat caracterele biologice, ceea ce ar influența asupra calității produsului alimentar.

Medicul bacteriolog este și el obligat să cunoască această microfloră specifică, pentru a o putea diferenția de o floră concomitentă accidentală.

■ *Microflora nespecifică* este ocazională, ea impurifică produsul alimentar. Contaminarea cu microflora nespecifică are loc atunci când se ignorează și nu se respectă regimul sanitaro-igienic în procesul pregătirii, păstrării și transportării produsului.

Microflora nespecifică poate fi reprezentată prin câteva grupe de microorganisme:

- a) microflora saprofită, care include diferiți agenți ai alterării;
- b) indicatori microbiologici cum sunt: coliformii, stafilococii, enterococii, clostridiile ș. a.;
- c) microflora patogenă ca *S. aureus*, *Salmonella*, *Shigella* ș. a.

Examenul bacteriologic sanitar al produselor alimentare se efectuează în următoarele scopuri:

- a) pentru aprecierea calității produsului după indicatorii microbiologici și dacă produsul alimentar nu prezintă un pericol epidemiologic (examinări planificate);
- b) pentru depistarea eventualelor agenți ai toxinfecțiilor și intoxicațiilor alimentare sau a toxinelor lor (în cazul suspiciunii unui produs alterat);
- c) pentru a determina cauza alterării produsului;
- d) pentru investigarea unor izbucniri epidemice (limitate sau în masă).

Analiza microbiologică a produselor alimentare are unele particularități legate de consistența alimentului, caracterul prelucrării și conservării, durata permisă de păstrare.

În produsele lichide condițiile de multiplicare și răspândire a microbilor în tot produsul sunt mai favorabile. În produsele solide răspândirea microorganismelor este localizată, cu o concentrație mai mare a lor la suprafață. Dezvoltarea florei microbiene în produs depinde de pH, concentrația de NaCl, zahăr, conservanți etc.

Produsele alimentare se impart in urmatoarele grupe:

■ produse care nu se supun unei prelucrări termice (materia primă, unele semifabricate);

■ produse care se supun prelucrării termice;

■ produse alimentare ce conțin o floră microbiană specifică;

■ conservele.

Produsele culinare finisate se examinează în cadrul anchetei sanitare a întreprinderilor de alimentație publică și a celor care comercializează alimente cu amănuntul (cantine; blocurile alimentare din instituțiile preșcolare, școli, licee; bufete; magazine de preparate culinare etc.). Aceste obiective sunt examinate:

■ vara o dată pe lună, iar obiectivele suspecte de două ori pe lună;

■ iarna o dată la două luni și lunar obiectivele suspecte.

Se examinează:

— gustările reci: salate, vinegrete, carne rece, pește fiert, prăjit, copt, tartine cu salam, cârnați, pateuri etc.;

— alimentele servite la felul I: borșuri, supe, ciorbe;

— alimentele finisate pentru felul II: preparate din carne tocată, din carne tăiată mărunt, din pește, diverse garnituri, sosuri;

— alimentele servite la felul III: compoturi, creme gelatinoase, băuturi de firmă;

— produsele acidolactice: brânză, smântână, chefir, iaurt ș. a.;

— băuturile nealcoolice.

ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A LAPTELUI ȘI PRODUSELOR LACTATE

62.1. DATE GENERALE

Laptele este un mediu favorabil nu numai pentru supraviețuirea microorganismelor, ci și pentru creșterea și multiplicarea lor. El conține o cantitate mare de nutrienți (proteine, glucide, grăsimi, minerale ș. a.) într-o formă ușor asimilabilă pentru bacterii.

Contaminarea laptelui poate avea loc pe mai multe căi și în special de pe ugerul animalelor, de pe mâinile îngrijitorilor și ale mulgătoarelor, din aer, de pe aparatele de muls, din vasele de păstrare.

În timpul păstrării laptelui la temperatura camerei are loc schimbul firesc al fazelor de dezvoltare a microflorei:

- *Faza bactericidă*, în care substanțele bactericide din lapte (lizozimul, anticorpii ș. a.) inhibă dezvoltarea bacteriilor. Această fază durează 1—2 ore, iar la temperatura frigiderului până la 24—36 ore.

- *Faza microflorei mixte*, în care bacteriile de contaminare se dezvoltă independent pe seama abundenței nutrienților din lapte. Durează în medie 12 ore.

- *Faza streptococilor acidolactici*, în care predomină multiplicarea streptococilor acidolactici. Ei fermentează lactoza din lapte până la acid lactic, care reduce brusc pH-ul și înlătură microorganismele sensibile la mediul acid, inclusiv a inșiși streptococilor. Durează 48 ore.

- *Faza bacililor acidolactici*. Acești bacili sunt mai rezistenți la un pH acid în comparație cu streptococii. Însă din cauza concentrației crescânde de acid lactic sunt inhibați și bacilii acidolactici.

- *Faza microflorei fungice*. Această microfloră utilizează acidul lactic, laptele își pierde calitățile de produs alimentar. Dezvoltarea microflorei fungice neutralizează mediul și creează condiții favorabile pentru multiplicarea bacteriilor de putrefacție, care descompun caseina.

Microflora specifică a produselor lactate este reprezentată prin diverse specii microbiene, care se adaugă special pentru a da produsului anumite calități gustative. Pentru brânză, smântână, chefir, iaurt se utilizează specii cum sunt: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces kefir*. La pregătirea untului se folosește *Streptococcus cremoris*, pentru producerea diverselor tipuri de brânză se introduce *Penicillium roquefortii*.

Microflora nespecifică, saprofită include agenți ai alterării și putrefacției din genurile *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ș. a. Brânzeturile se alterează și datorită dezvoltării unor levuri (e.g. *Rhodotorula* formează un mucilagiu roz, *Torulopsis* un mucilagiu galben) și mucegaiuri (e.g. *Mucor*, *Oospora*,

Penicillium, *Scopulariopsis* sau *Geotrichum*, care colorează și dau anumite mirosuri).

Indicatorii microbiologici ai calității laptelui și produselor lactate sunt: coliformii, enterococii, stafilococul auriu ș. a.

Din flora patogenă, în lapte și lactate se pot depista *Salmonella*, *Shigella*, *Brucella*, *Mycobacterium* ș. a.

Analiza microbiologică sanitară a laptelui și produselor lactate se efectuează în conformitate cu cerințele reglementate de o serie de documente:

1. STAS 9225-84 «Laptele și produsele din lapte. Metodele analizei microbiologice»;
2. «Indicații metodice pentru efectuarea investigațiilor bacteriologice sanitare la întreprinderile producătoare de fabricate din cremă și de patiserie» Nr. 1351 din 26.09.75;
3. «Normativele și metodele controlului microbiologic al produselor pentru alimentarea copiilor pregătite la bucătăriile de lapte din sistemul ocrotirii sănătății» nr. 42-123-4423 din 31.08.87;
4. STAS 26809-86 «Laptele și produsele lactate. Regulile de primire, recoltare și pregătirea probelor pentru analiză»;
5. STAS 13264-88 «Laptele de vacă. Cerințele pentru achiziționare».

62.2. EFECTUAREA ANALIZELOR

62.2.1. Metode de clasificare calitativă a laptelui pentru colectarea din gospodărie

În gospodărie se determină clasa laptelui prin *metoda reductazei*. Această metodă se bazează pe reducerea albastrului de metilen de către enzimele de oxidoreducere eliminate de către microorganisme în lapte. După timpul de decolorare a albastrului de metilen se apreciază contaminarea bacteriană a laptelui crud.

Pentru efectuarea probei, se amestecă 20 ml lapte cu 1 ml soluție albastru de metilen, se agită și se termostatează eprubetele la 37°C. Se citesc rezultatele după 20 minute, 2 ore și 5 și 1/2 ore. Intervalul de timp în care apare decolorarea determină clasa laptelui (tabelul 62.1).

Tabelul 62.1. Aprecierea microbiologică a calității laptelui prin proba reductazei

Clasa	Calitatea	Durata decolorării	Cantitatea aproximativă de bacterii/ml
I	Bună	>5 ore și 30 minute	$<5 \cdot 10^5$
II	Satisfăcătoare	2—5 ore și 30 minute	$5 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^6$
III	Nesatisfăcătoare	Până la 2 ore	$4 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$
IV	Total nesatisfăcătoare	<20 minute	$>20 \cdot 10^6$

Pentru laptele de vacă achiziționat din gospodărie de către întreprinderile de colectare sunt stabilite trei calități după indicatorii citobacteriologici (tabelul 62.2). Laptele crud care nu corespunde calității II se consideră nesatisfăcător și nu se achiziționează pentru scopuri alimentare.

Tabelul 62.2. Indicatorii citobacteriologici ai calității laptelui

Indicatorii	Cantitatea		
	Superioară	I	II
Contaminarea bacteriană	$<3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^6$
Celule somatice (leucocite, celule somatice)	$<5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 - 10^6$	>106

Laptele pasteurizat trebuie să corespundă altor cerințe. El se ambalează în pachete și sticle. Sunt stabilite următoarele grupe calitative:

- grupa A, cu cel mult 50 000 microorganisme/ml, iar titrul coli de cel puțin 3,0 ml;
- grupa B, cu numărul total de germeni de până la 100 000/ml, iar titrul coli de 0,3;
- grupa C, cu numărul total de germeni de până la 200 000/ml, iar titrul coli de 0,3.

62.2.2. Recoltarea probelor și pregătirea lor pentru analiza laptelui și produselor lactate

Pentru prelevarea probelor de lapte, în prealabil se curăță și se spală capacul bidoanelor, butoaielor sau borcanelor. Se prelevă apoi aseptice, cu o lingură sau polonic, probe de 250 ml, care se introduc în flacoane sterile.

Produsele solide (brânza, untul) se recoltează cu un instrument special. Se arde în prealabil suprafața calupului cu o spatulă incandescentă, apoi se introduce instrumentul oblic, în profunzime, și se prelevă o probă medie de 10 g. Proba medie din lapte, frișcă, smântână, chefir este de 50 ml. Din înghețată se recoltează 25—50 g după ce s-a înlăturat stratul de la suprafață cu o grosime minimă de 2,5 cm.

În cazul produselor în ambalaj mic de consum se recoltează câte 1—2 bucăți din fiecare lot și apoi se pregătește proba medie. Produsele solide se omogenizează înainte de examinare, într-un mojar steril, cu soluție salină izotonă. Untul, crema, înghețata se topec în baia de apă la 45°C.

Fiecare probă trebuie însoțită de o fișă, în care se indică numărul probei, denumirea întreprinderii producătoare, denumirea produsului, data preparării, scopul analizei, data și ora recoltării, funcția și numele persoanei care a recoltat proba.

Examenul microbiologic trebuie efectuat imediat sau nu mai târziu de 4 ore de la recoltare, dacă se păstrează produsul la 4°C.

62.2.3. Analiza laptelui, frișcăi, chefirului, iaurtului

Se amestecă 10 ml de produs cu 90 ml soluție salină izotonă, pentru a obține diluția inițială 10^{-1} . Din această diluție se pipetează 1 ml într-o eprubetă cu 9 ml din același diluent, pentru a obține diluția 10^{-2} .

Din produsele acidolactice (chefir, iaurt) nu se determină numărul total de microorganisme. Se examinează numai compoziția microflorei acestor produse. Se pregătesc frotiuri, care se colorează cu albastru de metilen. În preparat trebuie să se depisteze numai microorganismele specifice pentru produsul dat.

În lapte și frișcă se determină numărul total de germeni/ml. Pentru aceasta se introduce câte 1 ml din fiecare diluție în două cutii Petri sterile, în care se toarnă imediat

câte 10—15 ml geloză topită și răcită la 45°C. Se incubează cutiile 72 ore la 30°C, după care se determină media aritmetică a coloniilor de pe cutii și se face extrapolarea la 1 ml produs.

Coliformii se determină în toate produsele. Se însămânțează câte 1 ml de produs nediluat și câte 1 ml din diluția 10⁻¹ în câte 3 eprubete, care conțin câte 5 ml mediu Kessler cu tuburi Durham pentru captarea gazului. Se termostatează apoi eprubetele 24 ore la 37°C. Din eprubetele cu creștere și gaz se fac repicări, în sectoare, pe o placă cu mediul Endo. După 24 ore de incubare la 37°C, din coloniile tipice se efectuează frotiuri pe care le colorăm Gram. Coloniile bacililor gramnegativi se repică în mediul semilichid cu geloză și în mediul Koser (apă distilată, citrat de sodiu, sulfat de magneziu, albastru de metilen). Mediul semilichid cu glucoză se incubează la 43°C, iar mediul Koser la 37°C. La citirea rezultatelor luăm în considerație numai coliformii citratnegativi (lipsa creșterii în mediul Koser, care își păstrează culoarea verde-măslinie inițială). Titrul coli se stabilește consultând tabelul 62.3.

Tabelul 62.3. Titrul coli în lapte, frișcă, chefir și iaurt

Coliformi depistați în volume, ml						Titrul coli
1	1	1	0,1	0,1	0,1	
—	—	—	—	—	—	>3,0
+	—	—	—	—	—	>3,0
+	+	+	+	+	—	<0,3
+	+	—	+	+	+	<0,3
+	+	+	+	+	+	<0,3

În laptele și frișca pasteurizată titrul coli trebuie să fie de cel puțin 3,0 ml, iar în chefir și iaurt de 0,3.

62.2.4. Analiza smântânei, cașcavalului, untului, înghețatei, cheagului

Untul și înghețata mai întâi se topesc la 40°C. Cașcavalul, în cantitate de 10 g, se fărâmițează în mojar. Cheagul se neutralizează cu soluție 10% bicarbonat de sodiu. Se pregătește diluția inițială 10⁻¹ (10 ml sau g de produs + 90 ml soluție salină izotonă). Apoi se efectuează, în mod uzual, diluții decimale succesive de la 10⁻² până la 10⁻⁶. Se însămânțează câte 1 ml din toate diluțiile (exceptând înghețata la care se însămânțează numai diluția inițială) în eprubete cu câte 5 ml mediu Kessler, care sunt incubate 48 ore la 37°C. Din probele pozitive se fac repicări în sectoare pe plăci cu mediul Endo, cu incubare 24 ore la 37°C. Din coloniile tipice se efectuează frotiuri, care se colorează Gram. Se repică coloniile bacililor gramnegativi în mediul semilichid cu glucoză și mediul Koser. Dacă apare gaz în mediul cu glucoză, se determină titrul coli, consultând, după caz, tabelele 62.4 și 62.5.

Tabelul 62.4. Titrul coli în înghețată, amestecuri lactate, lapte condensat cu zahăr

Coliformi depistați în volume, ml			Titrul coli
0,1	0,1	0,1	
—	—	—	>0,3
+	—	—	>0,3
+	+	—	<0,3
+	+	+	<0,3

Tabelul 62.5. Titrul coli în unt, smântână, cașcaval

Coliformi depistați în volume, ml						Titrul coli
1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	
—	—	—	—	—	—	>1,1
+	—	—	—	—	—	1,1
+	+	—	—	—	—	0,1
+	+	+	—	—	—	0,01
+	+	+	+	—	—	0,001
+	+	+	+	+	—	0,0001
+	+	+	+	+	+	0,00001

62.2.5. Analiza cremei, untului pentru cremă, siropurilor

Se topesc 50 g de cremă la 43°C, se prelevă 1 ml din stratul inferior și se introduce într-o eprubetă cu 9 ml apă peptonată 0,1%, pentru a obține diluția inițială 10⁻¹, din care se pregătesc apoi, în mod uzual, diluții succesive 10⁻², 10⁻³. Aceleași diluții se pregătesc și din siropuri, cu diferența că diluția inițială se obține din 10 ml sirop + 90 ml apă peptonată 0,1%. În aceste produse se determină prezența coliformilor și a stafilococilor.

Staphylococcus aureus se determină/g sau ml de produs. Se însămânțează câte 0,1 ml de produs nediluat pe geloză hiperclorurată cu ou și se incubează 24 ore la 37°C. Se verifică coloniile suspecte prin frotiuri colorate Gram și se repică pe geloză înclinată. Identificarea culturii obținute se face prin testul coagulazei și testul de fermentare anaerobă a manitei. Pentru necesități epidemiologice, se determină lizovarul.

Paralel se însămânțează câte 0,5 ml produs în două eprubete, care conțin bulion peptonat cu 6,5 și, respectiv, 10% NaCl. După 24 ore de incubare la 37°C, se fac repicări pe geloză hiperclorurată cu ou. Analiza ulterioară continuă cum este indicat mai sus.

Coliformii se determină prin însămânțarea a 1 ml din fiecare diluție în eprubete cu câte 5 ml mediu Kessler. După 24 ore de incubare la 37°C, se fac repicări, în sectoare, pe

plăci cu mediul Endo. Din coloniile tipice, apărute după 24 ore la 37°C, se pregătesc froțiuni colorate Gram. Depistarea bastonașelor gramnegative permite calcularea titrului coliformilor.

62.2.6. Analiza producției bucătăriilor de lapte pentru copii (produse acidolactice pentru alimentarea copiilor)

Coliformii se determină în 3 ml produs, pe care îi însămânțăm în 30 ml mediu Kessler cu repicare ulterioară pe mediul Endo și examenul coloniilor.

Escherichia coli se depistează prin însămânțarea a 10 ml produs în 90 ml mediu Kessler, cu incubare 24 ore la 44—45°C. Dacă apare creștere, se fac repicări pe mediul Endo cu identificarea ulterioară a coloniilor.

Staphylococcus aureus, *Salmonella* se determină în 10 ml și, respectiv, în 50 ml produs. Ele trebuie să lipsească din produsele acidolactice destinate pentru alimentația copiilor.

Aceleași investigații se efectuează în cazul examinării și a altor tipuri de produse pregătite în bucătăriile de lapte pentru copii (e. g. produsele păstoase, terciurile, băuturile).

În amestecurile lactate pasteurizate titrul coli trebuie să fie mai mare de 11,1. Numărul total de microorganisme în produsele bucătăriilor de lapte trebuie să nu depășească 500/ml în lipsa stafilococilor coagulazopozitivi și a tulpinilor enteropatogene de *E. coli*.

În amestecurile lactate pentru copii, la indicații epidemiologice, pot fi determinate *E. coli* în 11 g, salmonelele în 25; 50 și 100 g, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, enterococii, levurile și mucegaiurile per gram de produs. Aceste microorganisme trebuie să lipsească în orice produs pregătit pentru consum.

ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A CĂRNII ȘI PRODUSELOR DIN CARNE

63.1. DATE GENERALE

Carnea, care conține din abundență toți nutrienții necesari pentru creșterea și multiplicarea diverselor bacterii, levuri și mucegaiuri, este un produs ușor alterabil.

Mușchii, organele interne și sângele animalelor sănătoase sunt de regulă sterile.

Contaminarea bacteriană a cărnii poate fi primară sau secundară.

■ *Contaminarea primară*, adică în cursul vieții, se produce: cu bacterii invazive în cursul unor boli cum sunt antraxul, bruceloza, tuberculoza ș. a.; cu bacterii din microflora intestinului, care, la animalele debilitate prin foame sau alte condiții de stres, trec bariera intestinală spre sânge și organe.

■ *Contaminarea secundară* are loc în timpul sacrificării, despicării și tranșării carcanelor și este urmarea încălcării normelor tehnologice. Se produce cu microorganisme de pe mâinile lucrătorilor, din aer, de pe utilaj, ambalaj etc. Produsele din carne se contaminatează prin nerespectarea regimului tehnologic de preparare, conservare și transport.

Pe suprafața carcanei animalelor sacrificate se depistează o floră microbiană variată, reprezentată în special prin stafilococi, enterococi, escherichii ș. a. În procesul păstrării ulterioare caracterul florei microbiene se modifică.

La temperaturi joase pozitive (la frigider) predomină microorganisme capabile să se multiplice la asemenea temperaturi, ca *Pseudomonas*, *Achromobacter*. Uneori pe suprafața cărnii apare o mucozitate mai frecvent produsă de *Proteus*.

În carnea congelată se dezvoltă diverse specii de mucegaiuri din genurile *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, care pot produce mucegăirea cărnii. La decongelare, în carne se activează procesele microbiologice, din cauza ridicării temperaturii, condensului și ieșirii unei cantități considerabile de suc.

În cazul nerespectării normelor de conservare, în carne încep procese de descompunere (putrezire), datorate dezvoltării microorganismelor aerobe și anaerobe ca *P. vulgaris*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, care au o activitate proteolitică pronunțată.

În procesul prelucrării microflora cărnii se modifică, din cauza contaminărilor secundare. La tocarea cărnii microorganismele de la suprafață trec în profunzimea produsului, unde se creează condiții favorabile pentru multiplicare. Flora microbiană diferă în diferite produse din carne. Așadar, în mezelurile afumate se depistează bacterii acidolactice, levuri, micrococi, bacterii sporogene. În cârnați fierți majoritatea absolută a florei microbiene este reprezentată de bacterii sporulate.

Carnea și produsele din carne sunt deseori implicate în toxiinfecții și intoxicații alimentare. Astfel în jambon și cârnați este posibilă multiplicarea *C. botulinum* cu

acumulare de toxină botulinică. În pārjoale și alte preparate din carne tăiată mărunt se pot dezvolta microorganisme cum sunt *C. perfringens*, *B. cereus*, *Proteus*, *Salmonella*, iar în salate din carne tocată și în răciturile se pot multiplica salmonele, enterococi, stafilococi, shigele, escherichii ș. a.

Analiza microbiologică sanitară a cărnii și produselor din carne se efectuează în conformitate cu cerințele reglementate prin următoarele documente:

1. STAS 23399-78 «Carnea. Metodele analizei chimice și microscopice a prospețimii»;
2. STAS 2137-75 «Carnea. Metodele analizei bacteriologice»;
3. STAS 4288-76 «Fabricatele culinare și semifabricatele din carne tocată. Regulile de achiziționare și metodele de studiere»;
4. STAS 9958-81 «Mezeluri și produse din carne. Metodele analizei bacteriologice».

63.2. EFECTUAREA ANALIZEI

63.2.1. Analiza microscopica

Metoda se bazează pe determinarea microscopică, pe amprente, a numărului de bacterii și a gradului de descompunere a țesutului muscular.

Se cauterizează suprafața cărnii cu o spatulă incandescentă, apoi cu un foarfece steril se recoltează bucăți de $2,0 \times 1,5 \times 2,5$ cm din care se pregătesc amprente, care se usucă, se fixează și se colorează Gram. Se examinează 25 câmpuri microscopice pe fiecare amprentă.

Carnea se consideră proaspătă, dacă evidențiem până la 10 bacterii per câmp microscopic și lipsesc urme de descompunere a țesutului muscular.

Prospețimea cărnii este îndoielnică dacă depistăm până la 30 bacterii (coci, bastonașe) per câmp microscopic și sunt urme de descompunere a țesutului muscular (nucleele fibrelor musculare sunt în stare de descompunere, iar striția fibrelor se vizualizează cu greu).

Carnea este învechită dacă depistăm mai mult de 30 bacterii per câmp microscopic și constatăm dispariția aproape completă a nucleelor și striției fibrelor musculare.

63.2.2. Examenul microbiologic al cărnii și subproduselor de la orice specie animală sacrificată

Standardul de stat 21237-75 prevede examinarea cărnii și a subproduselor, pentru depistarea agentului patogen al antraxului, salmonelelor, escherichiilor, proteilor, listeriilor, cocilor, agentului cauzal al rujetului porcului, clostridiilor și a toxinelor lor. Situația epidemiologică este cea care indică microorganismele de depistat.

Examenul bacteriologic al cărnii și subproduselor se efectuează în conformitate cu regulile de expertiză veterinară și sanitară și la cererea organelor care efectuează controlul sanitar și veterinar.

Recoltarea probelor și pregătirea pentru analiză. În funcție de microbii urmăriți, se recoltează aseptice bucăți din mușchi, ficat de cel puțin $8 \times 6 \times 6$ cm, precum și ganglioni limfatici. Se învelesc probele în folie din polietilenă sau pergament și se introduc într-un pachet de hârtie. În fișa de însoțire se indică denumirea produsului, întreprinderea, numărul probei, data recoltării, diagnosticul prezumtiv, numele persoanei care a recoltat proba.

În laborator, din fiecare probă, se înlătură țesutul adipos și conjunctiv. Se introduc apoi probele în alcool pe 2—3 minute și se arde suprafața acestora. Din fiecare probă se taie segmente de $2 \times 1,5 \times 2,5$ cm, care se fărâmițează cu foarfece sterile. Materialul de examinat, în cantitate de 15 g, se amestecă cu 15 ml soluție salină izotonă și se omogenizează în omogenizatorul electric. Se limpezește suspensia obținută timp de 10 minute, apoi se epuizează 1—2 picături din supernatant pe câte o placă cu geloză nutritivă, cu mediul Endo sau Levine. Paralel se însămânțează 20 ml de suspensie într-un flacon cu 50 ml mediu de îmbogățire (mediul Müller-Kauffmann, mediul cu selenit, mediul «M»). Se incubează toate mediile însămânțate timp de 24 ore la 37°C . Pe plăcile cu geloză se urmăresc coloniile tipice pentru *B. anthracis*, listerii, coci și a. Pe mediile Endo sau Levine urmărim coloniile tipice pentru familia *Enterobacteriaceae*.

Depistarea *B. anthracis*. Din organele parenchimatose, ganglionii limfatici sau din organele afectate se pregătesc câteva amprente, care se usucă în aer, se fixează și se colorează Gram, cu soluție 2% safranină sau cu soluție Rebigier (violet de gențiană cu formalină). Prin ultima metodă citoplasma se colorează în violet-închis și capsula în roșu-violet.

Izolarea culturii pure se face prin însămânțarea produsului pe geloză și în bulion peptonat. Pe mediul solid vor crește coloniile cu suprafața rugoasă și marginile dantelate. În bulion se formează un sediment ce amintește un flocon de vată.

Identificarea culturii izolate se face prin testul «colierului de perle», capacitatea de formare a capsulei *in vitro*, patogenitatea pentru șoareci, sensibilitatea la fagul γ anti-*B. anthracis*.

Depistarea cocilor patogeni. Se pregătesc din produs frotiuri colorate Gram, pe care se urmăresc prezența bacteriilor și caracterele lor morfotinctoriale. Se însămânțează proba pe geloză-sânge și în bulion glucozat și se analizează caracterul creșterii. Stafilococii tulbură omogen bulionul, iar streptococii cresc la fundul eprubetei și pe pereți, mediul rămânând transparent.

Patogenitatea stafilococilor se determină prin testul coagulazei.

Determinarea salmonelelor. Se însămânțează produsul direct pe mediile Endo sau Levine și paralel pe mediile de îmbogățire. Se incubează culturile 24 ore la 37°C . Pe mediile diferențiale salmonelele formează coloniile rotunde, incolore, semitransparente.

Din mediul de îmbogățire se fac repicări pe mediul bismut-sulfid. Pe acest mediu coloniile de salmonele sunt negre cu luciu metalic.

Identificarea culturii pure obținute se efectuează prin studierea caracterelor biochimice și serologice.

Determinarea escherichiilor. Se însămânțează produsul pe mediile diferențiale Endo, Levine sau Ploskirev. După o incubare de 24 ore la 37°C se citesc rezultatele. Pe mediul Endo cresc coloniile roșii cu luciu metalic sau coloniile roz cu centrul roșu; pe mediul Levine coloniile sunt de culoare violetă-închis, iar pe mediul Ploskirev roșie-cărămizii. Din coloniile suspecte se efectuează frotiuri, care se colorează Gram, pentru verificarea caracterelor morfotinctoriale, și preparate între lamă și lamelă pentru verificarea mobilității.

Cultura pură se identifică prin testele de producere a indolului (pozitiv), H_2S (negativ), hidroliza urcei (negativ), fermentarea lactozei 10% (pozitiv), creșterea pe mediul cu citrat de sodiu (negativ).

Speciile de *Proteus* se pun în evidență prin însămânțarea produsului în apa de condensare a pantei de geloză după metoda Schukevici. A doua zi apare creștere în căjărare pe panta de geloză. Microscopic observăm bastonașe gramnegative, mobile. Bacteriile din acest gen fermentează glucoza, nu fermentează manita și lactoza, hidrolizează ureea și produc fenilalanindezaminază.

Clostridiile se depistează microscopic pe baza formei, prezenței sporilor și, eventual, capsulei. Izolarea în cultură pură se face prin însămânțarea suspensiei de produs în mediul Kitt-Tarozzi, iar identificarea prin studierea caracterelor biochimice și prin reacția de neutralizare a toxinei pe șoareci albi.

63.2.3. Analiza sanitaro-bacteriologică a mezeturilor și produselor din carne

STAS-ul 9958-81 se referă la: toate tipurile de cârnați: umpluți, fierți, semiafumați, caltaboși, lebăvrurști, crenvrurști, debrețini; pateuri, răcături și la alte produse din carne de porc, vacă, oaie, păsări.

Din fiecare lot de mezeturile se recoltează două probe cu lungimea de 15 cm, din care se pregătește o probă medie. Proba medie din crenvrurști și debrețini o alcătuim din câteva exemplare luate din diferite locuri.

Din produsele fără peliculă (pateuri, răcături) se recoltează o probă cu masa de 200—250 g din trei unități de produs. Probele medii se impachetează în pergament steril și se analizează nu mai târziu de 4 ore de la recoltare cu păstrare la 6—8°C.

Din fiecare probă se omogenizează 20 g sau se fărâmițează în mojar, adăugând, fracționat, 80 ml apă peptonată 0,1%, pentru a pregăti diluția 1:5. Din această diluție se transferă 5 ml într-o eprubetă cu 5 ml apă peptonată 0,1%, pentru a pregăti diluția 10^{-1} . Diluția 10^{-2} se obține pipetând 1 ml din diluția 10^{-1} într-o eprubetă cu 9 ml apă peptonată 0,1%. Toți indicatorii se determină utilizând metodele descrise în capitolele anterioare. Numărul total de microorganisme se află prin însămânțarea volumelor de 1 ml din diluțiile 10^{-1} și 10^{-2} . Sunt prevăzute depistarea coliformilor și *S. aureus* în 1 g de produs, *Proteus* în 0,1 g, salmonelilor în 25 g, iar a clostridiilor în 0,1 g.

În cârnații fierți de toate tipurile, crenvrurști, debrețini se admit până la 500—1000 bacterii/g, în lipsa altor indicatori în cantitățile de produs specificate mai sus.

63.2.4. Analiza produselor culinare și semifabricatelor din carne tocată

STAS 4288-89 se referă la produsele culinare și semifabricatele din carne tocată (pârjoale, șnițele, biftecurei, rulade, chiftele ș. a.). Aceste produse se primesc în loturi și, în funcție de mărimea lotului, se recoltează pentru analiză de la 3 până la 35 de unități. Probele se introduc în vase sterile, care se sigilează. În fișa de însoțire se indică întreprinderea producătoare, denumirea produsului, data și ora finisării procesului tehnologic, volumul lotului din care s-a recoltat proba, scopul analizei, locul, data și ora recoltării, funcția și numele persoanei care a recoltat proba.

Se prelevă și se examinează, separat, probe din partea exterioară și cea interioară ale produselor.

Se fărâmițează în mojar 5 g de produs și se amestecă cu 45 ml soluție salină izotonă, pentru a obține diluția 10^{-1} . Se pregătesc apoi diluții până la 10^{-2} pentru produsele finite, iar pentru semifabricate până la 10^{-3} . În aceste produse se determină numărul total de microorganisme/g. *S. aureus* se determină în 1 g de produs, iar coliformii în 0,5 g numai de produse finite. Pentru a izola *Proteus*, se însămânțează în apa de condens a pantei de geloză 0,5 ml din diluția 10^{-1} a produsului examinat.

Pentru depistarea salmonelilor se însămânțează 0,1 ml din diluția 10^{-1} a suspensiei în mediul cu bismut-sulfid și, paralel, 10 ml din aceeași suspensie și bucăți de câte 2—3 g în flacoane cu 50 ml mediu cu magneziu. Identificarea ulterioară a culturilor izolate se efectuează prin testele uzuale.

ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A PEȘTELUI ȘI PRODUSELOR DIN PEȘTE

Țesutul muscular al peștelui sănătos este lipsit de floră microbiană, dar contaminarea postmortem evoluează foarte repede pornind de la flora microbiană din intestin și de la flora de pe suprafața corpului dependentă de microflora bazinului acvatic habitat de pește.

Peștele aparține produselor ușor alterabile. Îndată după prindere, în țesuturile peștelui încep modificări fermentative sub influența bacteriilor psihrofile. Flora microbiană a peștelui proaspăt prins este reprezentată mai ales de bacterii din genurile *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, precum și de flora halofilă ca *V. parahaemolyticus*. În peștele prins din ape impurificate se pot întâlni și reprezentanți din familia *Enterobacteriaceae* ca *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus* ș. a.

În procesul transportării, prelucrării și păstrării peștele se poate contamina cu diverse microorganisme din aer, sol, ambalaj, de pe mâinile lucrătorilor, utilaj etc.

Peștele și produsele din pește pot cauza uneori toxiinfecții cu *Proteus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus* ș. a.

Probele pentru analiză se recoltează în borcane sterile: câte 300 g din 3 unități de ambalaj și transport. Din rulade și pește cu dimensiuni mari se taie segmente transversale din partea capului și a cozii. Peștele mărunț se recoltează întreg. Pe fișa de însoțire trebuie indicate denumirea produsului, numărul lotului și a probei, data recoltării.

Se omogenizează proba prin fărâmițare cu un cuțit steril sau în omogenizator electric, apoi se introduc 10 g într-un flacon cu 90 ml apă peptonată 0,1%, pentru a obține diluția 10^{-1} .

Numărul total de microorganisme se determină prin însămânțarea a câte 1 ml din diluțiile decimale succesive în 2 cutii Petri sterile, în care, imediat, se toarnă și se omogenizează geloză topită și răcită la 45°C.

Pentru depistarea stafilococilor coagulazopozitivi se însămânțează 1 g de produs din suspensia inițială în bulion peptonat cu 6,5% CINA.

Coliformii se determină prin însămânțarea a 10 ml din suspensia diluată 10^{-1} (1 g de produs) în 50 ml mediu Kessler.

Salmonellele se depistează prin însămânțarea directă a produsului în mediul cu bismut-sulfid și, paralel, a 25 g produs în 100 ml mediu cu magneziu.

Izolarea ulterioară a culturilor pure și identificarea lor se fac după schemele cunoscute.

La 1 g de pește prăjit, copt, pârjoale din pește se admit până la 1000 UFC bacteriene cu absența coliformilor și stafilococilor patogeni într-un gram de produs, iar a salmonellelor în 25 g produs.

În peștele afumat se admit 500—1000 UFC bacteriene cu absența stafilococilor patogeni în 1 g, a coliformilor în 10 g și a salmonellelor în 25 g produs.

PARTICULARITĂȚI DE EXAMINARE MICROBIOLOGICĂ A BĂUTURILOR

Se supun analizei bacteriologice apele minerale, apele dulci, compoturile, siropurile, berea și alte băuturi produse industrial, cvasul.

Analiza apei minerale. Se selectează sticle direct din fiecare lot. Se șterg cu alcool și se flambează capacul sticlei și deschizătorul. Se deschide sticla, se înlătură capacul metalic și se înlocuiește cu un dop din vată și tifon. Pentru a înlătura gazul din lichid, se mențin sticlele în termostat timp de o oră la 43°C. Examenul bacteriologic și aprecierea rezultatelor se efectuează ca și în cazul analizei apei de robinet. Apa minerală trebuie să conțină cel mult 100 UFC bacteriene/ml, iar titrul coli să fie de cel puțin 300.

În cazul *analizei compoturilor și băuturilor produse industrial* se apreciază mai întâi pH-ul lichidului cu hârtie indicator. În cazul unei reacții acide, se alcalinizează proba cu soluție 10% bicarbonat de sodiu până la un pH 7,2—7,4. În aceste produse se determină numărul total de microorganisme, coliformii în 10 ml și salmonelele în 50 ml.

Când se examinează *apele dulci produse industrial*, se selectează o sticlă ambalată pentru consum sau 200 ml recoltați pe parcursul procesului tehnologic. Se determină pH-ul și se procedează ca și la analiza compoturilor. Coliformii se determină după metoda descrisă la analiza apei de robinet.

Salmonelele se depistează în 25 ml, care se introduc în 25 ml mediu «M» cu incubare 24 ore la 37°C urmată de repicare pe plăci cu mediul Wilson-Blair. Coloniile tipice se identifică prin testele uzuale.

Probele de *bere și cvas* se termostatează o oră la 43°C. Dacă este necesar se neutralizează cu soluție 10% de bicarbonat de sodiu până la pH 7,0—7,2.

Pentru determinarea coliformilor, din berea de 12% se însămânțează 10 ml în 50 ml mediu Kessler, iar din berea de butoi sau din cvas câte 1 ml în eprubete cu 5 ml mediu Kessler. Obținerea culturii pure și identificarea ei se fac după schema uzuală. Salmonelele se depistează în 25 ml ca și în cazul băuturilor nealcoolice.

Din cauza prezenței microflorei specifice berea și cvasul nu sunt examinate pentru determinarea numărului total de microorganisme.

Siropurile, diluate de 10 ori cu apă sterilă, se examinează identic cu băuturile nealcoolice.

În băuturile care conțin zahăr se determină și bacteriile producătoare de mucilagiu, din care face parte și leuconostocul. Aceste bacterii sunt coci puțin alungiți, grampozitivi, așezați în perechi sau lanțuri scurte și formează capsule mari, mucoide. Pentru depistarea lor se însămânțează 1 ml de băutură în apă de levură cu 10% zaharoză sau pe plăci cu același mediu agarizat. Se incubează mediile însămânțate timp de 48 ore la 22—27°C. Prezența leuconostocului determină apariția de filamente mucoide în mediul lichid, iar pe mediul agarizat apariția de colonii mari, transparente, mucilaginoase.

ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A CONSERVELOR

66.1. DATE GENERALE

Conservele sunt produse alimentare în ambalaj ermetic închis și prelucrate termic (sterilizare sau pasteurizare), pentru ca să-și păstreze calitățile nutritive și organoleptice fără a prezenta pericol pentru sănătatea consumatorului.

Foarte frecvent produse conservate, cu bune calități organoleptice, nu sunt sterile din cauză că o parte din microorganisme sunt atenuate, dar supraviețuiesc (flora restantă). În conservele din carne, pește, legume predomină *Bacillus subtilis*, *B. mezentericus*, stafilococi, sarcine, mucegaiuri și levuri, bacterii termofile ș. a. Unele microorganisme produc gaz, care, concentrându-se în ambalaj, îl bombează. Altele nu formează gaz și determină alterarea conservelor fără ca ambalajul să bombeze.

Contaminarea conservelor cu microorganisme are loc din materia primă, din apa necondiționată, din condimente, de pe utilaj și liniile tehnologice, de la muncitori.

Conservele se împart în următoarele grupe:

1. Conserve cu pH mai mare de 4,4 din carne înăbușită, legume, fructe, pateuri, pește, produse pentru copii condiționate ca piureuri.
2. Produse din tomate (concentrate și neconcentrate).
3. Conserve cu pH 3,7—4,4 din castraveți, ciuperci marinate, salate, vinegrețe la care adaosul de acid este reglementat.
4. Marinade din legume cu pH mai mic de 3,7 (varză murată etc.).
5. Conserve din carne afumată, crenvurști, șuncă, jambon pasteurizate cu termen limitat de păstrare la 0—5°C în ambalaj ermetic.

Termeni utilizați curent la analiza conservelor:

Ermetizare — starea ambalajului (împachetării, astupării) care protejează conservele de pătrunderea microorganismelor în timpul sterilizării, păstrării și transportului.

Sterilitate — lipsa completă a microorganismelor viabile în produsul conservat.

Sterilitate industrială — lipsa în produs a microorganismelor capabile să se dezvolte la temperatura păstrării stabilită pentru produsul dat și a microorganismelor și toxinelor periculoase pentru sănătatea omului.

Capete vibrante — conserve închise normal după aspectul exterior, dar la care unul din capete se încovoie când se apasă capătul opus, iar la încetarea apăsării revine la aspectul normal.

Clancăt — conserve în ambalaj cu capacul umflat, care capătă poziție normală când se apasă cu degetul, însă se umflă capătul opus. La încetarea apăsării capacul se umflă din nou.

Bombaj — conserve cu ambalajul umflat care nu pot căpăta aspect exterior normal.

Termostatare — expunerea conservelor un anumit timp la o temperatură favorabilă pentru dezvoltarea microorganismelor din produs.

Analiza microbiologică sanitară a conservelor se efectuează în următoarele scopuri:

- investigarea intoxicațiilor alimentare pentru a stabili originea agentului cauzal;
- precizarea cauzelor defectelor și alterării;
- controlul sterilității și al sterilității industriale;
- depistarea microorganismelor patogene și toxigene.

Accastă analiză a conservelor este reglementată prin mai multe STAS-uri, care prevăd: selectarea recipientelor și determinarea ermetizării (8756.0.70); examinarea aspectului exterior, deschiderea ambalajului și pregătirea probei pentru analiză (26669.85); termostatarea (10444.0.75); aparatura, materialele și reactivii necesari (10444.1.75); depistarea stafilococilor coagulazopozitivi, microorganismelor aerobe și facultativ anaerobe mezofile și termofile, microorganismelor anaerobe mezofile și termofile, toxinei botulinice și *C. botulinum*, *C. perfringens*, *B. cereus*, bacteriilor acidolactice, levurilor, mucegaiurilor și numărului total de microorganisme (10444.2.75—10444.15.75).

Conservele se examinează în timpul preparării (materia primă, utilajul, condimentele), până la sterilizare, în timpul păstrării și la distribuția în rețeaua de consum.

Controlul planificat prevede aprecierea sterilității și sterilității industriale. La indicații epidemiologice se determină și alți indicatori în funcție de situație (e. g. intoxicații alimentare, alterare ș. a.): stafilococii coagulazopozitivi, *C. botulinum* și toxina botulinică, *C. perfringens*, *B. cereus*.

În caz de necesitate se apreciază prezența bacteriilor acidolactice, levurilor, mucegaiurilor.

66.2. EXAMINAREA CONSERVELOR

66.2.1. Recoltarea ambalajelor cu conserve

Din fiecare lot de conserve se pregătește o probă medie. Din conservele în ambalaj de tablă, sticlă sau polimeri cu volum de până la 1 litru proba medie se pregătește din 3 unități ambalate. La indicații epidemiologice se selectează un borcan la 500 unități, dar nu mai puțin de 3 și nu mai mult de 50. Din conservele cu defecte (capete vibrante, bombaj, clancăt) se alege cel puțin 3 unități din fiecare lot.

66.2.2. Examenul macroscopic al ambalajelor cu conserve

Aspectul exterior. Se urmăresc indicii relevanți pentru aprecierea microbiologică a calității. Astfel se controlează prezența perforațiilor, a fisurilor, se verifică dacă nu sunt scurgeri, deformări ale corpului, precum și defecte tip capete vibrante, clancăt ș. a.

Controlul ermetizării borcanelor. Se spală borcanele cu apă și săpun, se clătesc și se mențin 3—4 minute într-un vas cu apă încălzită la 80—85°C. Cantitatea de apă trebuie să fie de 4 ori mai mare decât volumul borcanului, pentru a asigura deasupra borcanului un strat minim de 5 cm de apă. Apariția unei șuvițe de bule de gaz indică lipsa ermetizării.

Termostatarea. Se termostatează conservele ermetice fără defecte vizibile. Nu se termostatează conservele pentru evidențierea toxinei botulinice, cele cu bombaj, cu semne de alterare microbiană și cele cu ambalaj neermetic.

Conservele cu pH mai mare de 4,4 se mențin 5 zile la 37°C, iar cele cu pH mai mic de 4,4 timp de 5 zile la 30°C, apoi 24 ore la temperatura camerei. Borcanele din termostat trebuie examinate zilnic și agitate.

66.2.3. Recoltarea din conținutul ambalajelor

Înainte de a recolta proba, se amestecă conținutul întorcând ambalajul (borcan, cutie) de câteva ori din capăt în capăt. Se șterge capacul cu alcool, apoi se aplică pe el un tampon de vată arzândă. Sub vata arzândă se introduce perforatorul flambat, se perforază capacul și se lărgeste orificiul, care se acoperă imediat cu o parte din cutia Petri sterilă. În raport cu consistența, se recoltează proba cu o pipetă ori linguriță sterilă.

66.2.4. Depistarea aerobilor mezofili

Se însămânțează câte 2 cm³ de produs în două eprubete cu 5—6 ml bulion glucozat 1%, care sunt incubate 5 zile la 37°C cu urmărirea zilnică a semnelor de creștere. În cazul tulburării mediului se efectuează și se examinează frotiuri colorate Gram și se testează catalaza.

Conservele nu trebuie să conțină floră aerobă.

66.2.5. Depistarea anaerobilor mezofili

Se însămânțează câte 2 cm³ de produs în două eprubete cu 12—13 ml mediu Kitt-Tarozzi în prealabil regenerat și se incubează eprubetele 5 zile la 37°C. Dacă apar semne de creștere, se recoltează material de la fundul eprubetei, se pregătește un frotiu colorat Gram și se controlează prezența catalazei. Dacă pe frotiu depistăm microbi grampozitivi fără activitate catalazică, se transferă 1—2 ml de cultură într-o cutie Petri sterilă și se acoperă cu geloză glucozată 1%. Pe suprafața gelozei solidificate se aplică o lamă sterilă în așa fel încât sub ea să nu se formeze bule de aer. Se incubează cutia 24—48 ore la 37°C. Apariția sub lamă a creșterii sau unor rupturi în geloză, la 3—5 mm la marginea lamei, indică prezența anaerobilor mezofili.

Dacă în conserve se depistează anaerobi mezofili diferiți de *C. perfringens* sau *C. botulinum* și dacă organoleptic produsul este normal, conservele se consideră sterile industrial.

66.2.6. Depistarea aerobilor termofili

Se însămânțează câte 2 cm³ de produs în două eprubete cu 5 ml de bulion peptonat cu amidon, care sunt incubate 72 ore la 55°C. La apariția creșterii, se pregătesc frotiuri pentru microscopie, se determină activitatea catalazică și se adaugă în eprubete o picătură din soluția indicatoare 0,04% de bromcrezolpurpur. Producerea catalazei și modificarea culorii mediului din albastru-violet în galben indică prezența aerobilor termofili capabili să producă înăcrirea conservelor.

66.2.7. Depistarea anaerobilor termofili

Se însămânțează câte 2 cm³ de produs în două eprubete cu 12 ml mediu Kitt-Tarozzi regenerat și se termostatează 72 ore la 55°C. În cazul creșterii, se efectuează și se examinează frotiuri colorate Gram și se determină activitatea catalazică.

MICROBIOLOGIA INTOXICAȚIILOR ALIMENTARE

Intoxicațiile alimentare sunt boli acute necontagioase, care se declanșează în urma consumului de alimente masiv contaminate cu anumite specii de microorganisme și toxinele lor.

Se disting intoxicații de origine microbiană și otrăviri nemicrobiene.

Intoxicațiile alimentare de origine microbiană se împart în: toxiinfecții; toxicoze (bacteriene și micotoxicoze); mixte.

67.1. TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE

67.1.1. Definiție și etiopatogenie

Toxiinfecțiile alimentare sunt boli acute declanșate de consumul alimentelor care conțin cantități mari de celule vii ale agentului patogen specific și ale endotoxinelor concentrate în produs prin moartea microbilor.

Condiția principală pentru dezvoltarea toxiinfecției alimentare este multiplicarea prealabilă a agentului patogen până la concentrații de 10^{7-9} bacterii/g de produs. Pătrunderea în tractusul digestiv a unor doze mari de agenți vii și a endotoxinei lor cauzează un sindrom de gastroenterită. În tractusul digestiv are loc multiplicarea ulterioară a agentului și simultan moartea unui număr mare de bacterii cu eliberarea endotoxinei, care se absoarbe din intestin și determină manifestările clinice.

Toxiinfecțiile alimentare trebuie diferențiate de bolile infecțioase cu poartă de intrare digestivă (ferba tifoidă, dizenteria ș. a.). Deși în ambele cazuri ingerăm microbi vii, pentru declanșarea unei boli infecțioase este suficient ca împreună cu alimentele să pătrundă o cantitate relativ mică de bacterii, care însă datorită virulenței lor particulare, se multiplică intensiv cauzând un proces patologic specific cu simptome clinice caracteristice.

Toxiinfecțiile alimentare sunt urmarea nerespectării normelor sanitare și a procesului tehnologic de preparare a alimentelor. Comparativ cu bolile infecțioase transmise pe cale alimentară, particularitățile toxiinfecțiilor alimentare sunt următoarele:

- se declanșează acut pe fondul unei sănătăți depline;
- au perioada de incubație comparativ scurtă (de regulă, câteva ore);
- afectează simultan un număr mare de persoane care au consumat același produs alimentar;
- au evoluție scurtă și se termină, de regulă, cu însănătoșire;
- nu au răspândire epidemică: boala nu se transmite de la bolnav la sănătos;
- lipsește starea de portaj îndelungat;

- simptomele clinice de bază sunt voma și diareea.

Agenții care cauzează toxiinfecții alimentare fac parte din grupul bacteriilor potențial patogene: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, serovarurile diareigene de *E. coli*, *B. cereus*, *C. perfringens* tip A, *E. faecalis* cu variantele *liquefaciens* și *zymogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, precum și bacterii din genurile *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* ș. a.

67.1.2. Agenții etiologici ai toxiinfecțiilor alimentare: biologia, izolarea și identificarea lor

Genul *Proteus*. Bacili gramnegativi, necapsulați, cu flageli și pili peritrichi. Se dispun solitar, în perechi sau lanțuri scurte. Particularitatea lor principală este creșterea serpinginoasă (câșărătoare) pe mediile solide. După însămânțare în centrul plăcii cu geloză, cultura invadează, progresiv, cu un vâl toată suprafața mediului.

Cauză a toxiinfecțiilor alimentare cu *Proteus* pot fi fabricatele din carne tocată, peștele, salatele din legume, vinegretetele, diverse garnituri.

Cultura pură de *Proteus* se obține prin însămânțarea produsului în apa de condensare a pantei de geloză după metoda Schukevici. Se pot utiliza și medii selective cu inhibitori ai florei de asociație. Identificarea culturii pure se efectuează prin studierea caracterelor biochimice: producerea de urează, fenilalanindezaminază, ornitindecarboxilază, indol, hidrogen sulfurat, fermentarea zaharurilor (tabelul 67.1).

Enterococii aparțin genului *Enterococcus* și fac parte din grupul D Lancefield al streptococilor. Sunt coci ovali, dispuși în perechi sau lanțuri scurte, uzual imobili, gram-pozitivi.

Toxiinfecții apar după consumul produselor lactate și a preparatelor din carne tocată contaminate cu enterococi în concentrații mari.

Izolarea culturii pure se efectuează prin însămânțarea pe medii selective cu polimixină, cristal violet. Rezultate bune se obțin pe mediul Slanetz-Bartley cu azid de sodiu și clorură de trifeniltetrazoliu. Pe acest mediu apar colonii mici, rotunde, bombate, de culoare vișinie-închis. După verificarea caracterelor morfotinctoriale, pe frotiu colorat Gram se testează catalaza. Enterococii sunt catalazonegativi.

Tabelul 67.1. Diferențierea principalelor specii de *Proteus*

Teste	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>
Urează	+	+
Fenilalanindezaminază	+	+
Ornitindecarboxilază	—	—
Indol	+	—
Hidrogen sulfurat	+	+
Fermentarea maltozei	+	—

Identificarea se bazează pe următoarele teste: creșterea în bulion bilitat 40%, la pH 9,6, în medii cu 6,5% NaCl, precum și la temperaturile critice de 10 și 45°C. Identificarea biochimică poate fi completată și cu identificarea antigenică.

Bacillus cereus este un bastonaș mare, grampozitiv, sporogen, mobil, necapsulat, dispus în lanțuri scurte. Izbucniri de toxiinfecții alimentare apar după consumul de pâñoale, diferite garnituri, înghețată, uneori și a produselor de patiserie.

Crește pe medii uzuale. În bulion crește difuz cu sediment floconos și o peliculă la suprafață. Pentru izolare este mai util mediul selectiv hiperclorurat cu polimixină și clorură de trifeniltetrazoliu. Pe acest mediu, după 24—96 ore la 30°C, apar colonii roșii-rubinii, mari, rugoase, cu margini dantelate.

Identificarea se bazează pe caracterele morfotinctoriale și de cultivare (colonii R hemolitice), și biochimice (producere de lecitază și absența fermentării manitei).

Vibrio parahaemolyticus a fost izolat pentru prima dată în 1963 de savanți japonezi. Este un microorganism larg răspândit în apele mărilor și oceanelor, deseori este izolat din produse alimentare de origine marină (pește, stridii, crabi, crevețe, moluște). Poate cauza toxiinfecții alimentare. Au fost descrise toxiinfecții cu *V. parahaemolyticus* în urma utilizării unor legume murate (castraveți, varză).

Este un vibriion gramnegativ, monotrich, foarte mobil, fără capsulă, nesporulat. Crește pe medii cu concentrație sporită de NaCl (3—7%) și la pH 7,8—8,2. Toxiinfecții alimentare sunt cauzate mai frecvent de serovarurile O4:K12 și O4:K8.

Izolarea culturii pure se face prin însămânțarea produsului pe mediu diferențial, o geloză alcalină și salină, cu zaharoză, penicilină și albastru de metilen. Culoarea mediului este albastră-verzuie. Pe acest mediu vibriionii formează colonii rotunde, bombate, semi-transparente, cu suprafața umedă și lucioasă. Câteva colonii suspecte sunt repicate în apă peptonată 1% clorură de sodiu, care este incubată 18—24 ore la 37°C. Pe suprafața mediului se formează o peliculă din care se pregătesc preparate umede între lamă și lamelă, pentru a observa mobilitatea, și frotiuri colorate Gram.

V. parahaemolyticus este oxidazopozitiv (coloniile se colorează în cafeniu-vișiniu la aplicarea reactivului dimetilparafenildiamină); nu fermentează zaharoza, lactoza; crește în medii cu 3—8% clorură de sodiu, dar nu și în cele cu 0,5 și 10%; decarboxilează lizina și ornitina; produce indol, nu produce hidrogen sulfurat; este hemolitic și nu produce acetilmetilcarbinol.

Genul Citrobacter. Bacili mici, gramnegativi, mobili, nesporulați, necapsulați. Sunt comensali în intestinul omului sănătos. Unele serovaruri pot cauza toxiinfecții alimentare după consumul saladelor și vinegretelor contaminate.

Cresc bine pe medii uzuale și pot utiliza citratul ca unică sursă de carbon. Spre deosebire de *E. coli* nu sunt inhibați pe medii cu săruri biliare și verde de briliant.

Pentru identificare se studiază caracterele biochimice: cresc pe mediul cu citrat (Simmons), nu produc fenilalanindezaminază, lizindecarboxilază și nici acetilmetilcarbinol, dau reacția cu roșu metil pozitivă, degradează zaharurile cu producere de acid și gaz.

Unele specii pot fi identificate prin aglutinare pe lamă cu serurile anti-O și anti-H corespunzătoare.

Yersinia enterocolitica. Bacterii ovoide, gramnegative, mobile numai la 22—29°C, nesporulate, posedă capsulă. Poate fi depistată în lapte, înghețată, carne.

Crește pe medii uzuale formând colonii mici, care cresc în dimensiuni peste 48 ore la 22—29°C. *Y. enterocolitica* produce endotoxină, iar unele serovaruri produc enterotoxină termostabilă.

Identificarea se face prin aglutinare cu seruri imune și prin studierea caracterelor biochimice. *Y. enterocolitica* scindează ureea, fermentează zaharoza, decarboxilează ornitina, nu produce H₂S, nu utilizează citratul.

Klebsiella. Bacili gramnegativi, imobili, cu pili peritrichi, nesporulați, au o capsulă bine dezvoltată.

Relativ rezistenți la factorii mediului, pot fi depistați în sol, apă, pe legume, în produsele lactate.

Cultivă pe mediile diferențiale Endo, Ploskirev. Formează colonii mari, mucoide, bombate, confluențe, lactozopozitive.

Identificarea se face prin aglutinare cu seruri imune și prin studierea caracterelor biochimice. Klebsielele degradează zaharurile cu formare de acid și gaz, utilizează citratul, scindează ureea, decarboxilează lizina, nu produc indol și H₂S, nu dezaminează fenilalanina, produc acetilmetilcarbinol, dau reacție negativă cu roșu metil.

67.2. TOXICOZELE BACTERIENE

Toxicozele bacteriene sunt boli acute declanșate prin consumul alimentelor care conțin exotoxină concentrată în ele după dezvoltarea agentului specific. În aceste cazuri agenții vii pot fi prezenți chiar și în concentrații mici.

67.2.1. Toxicoze cauzate de stafilococi

Staphylococcus aureus este agent potențial al unor intoxicații alimentare prin enterotoxina pe care o produce în 6 variante antigenice: A, B, C, D, E, F. Enterotoxina stafilococică este termorezistentă: la fierbere, în funcție de condițiile experimentului, se inactivează lent între 10 și 40 minute.

Intoxicațiile se declanșează mai frecvent după consumul laptelui și a unor produse lactate, produse de patiserie cu cremă, a cărnii și produselor din carne, mai ales tocată. În produsele acidolactice această enterotoxină nu se acumulează, pentru că dezvoltarea stafilococilor este inhibată de acidul lactic.

Stafilococii fiind răspândiți pretutindeni, pericol poate prezenta orice produs în care s-au multiplicat stafilococi până la concentrații de 10^{5-7} UFC/g. Un asemenea produs poate fi nemodificat organologic, însă el este periculos prin concentrația enterotoxinei.

Stafilococii cultivă pe geloză hiperclorurată cu lapte sau cu lapte și ou, în care concentrația crescută de clorură de sodiu inhibă dezvoltarea microflorei asociate. Cultura izolată se identifică după schema uzuală.

Prezența enterotoxinei atât în produsul alimentar, cât și în culturile izolate se determină prin reacția de precipitare în gel cu serurile imune antitoxice A, B, C, D, E și F. Ca antigen servește extractul din produsul alimentar și filtratul culturii de stafilococi crescuți în bulion peptonat.

Se poate efectua și reacția de hemaglutinare indirectă, în care utilizăm eritrocite cu anticorpi anti-enterotoxină adsorbiți pe suprafață. În lipsa acestor reactivi este utilă proba biologică: produsul suspectat sau filtratul culturii izolate se administrează per os la mătănași sau cățeluși de 1—1,5 luni. În interval de 30—60 minute enterotoxina stafilococică determină vomă și diaree. Animalele se însănătoșesc o dată cu eliminarea toxinei din organism.

67.2.2. Toxicoze cauzate de *C. botulinum*

Toxina botulinică determină intoxicații severe, cu un procent considerabil de cazuri letale.

C. botulinum habitează în intestinul animalelor, păsărilor, peștilor, de unde, cu fecalele, ajunge în mediul înconjurător și impurifică solul și produsele alimentare.

Este un bastonaș gram pozitiv, peritrich, necapsulat, cu spori subterminali ovali.

Botulismul, în absoluta majoritate a cazurilor, apare după consum de alimente: conservate în casă, ciuperci murate și marinate, jambon, pește afumat, cârnați ș. a. Sterilizarea inefficientă a acestor conserve permite germinarea ulterioară a sporilor de *C. botulinum* cu acumularea toxinei botulinice în aliment, iar consumul lor fără prelucrare termică ulterioară lasă activă toxina.

C. botulinum este un anaerob strict, se dezvoltă la temperatura de 28—35°C. În coloana de geloză glucozată formează colonii translucide cu periferia mai opacă; examinate sub lupă aceste colonii apar ciuruite cu mici bule de gaz.

Antigenic bacilul botulinic este omogen, dar toxina produsă are 7 serovaruri: A, B, C, D, E, F și G. Boala este cauzată mai frecvent de serovarurile A, B sau E. Toxina botulinică este termosensibilă (distrușă în două minute la temperaturi între 90 și 60°C sau mai puțin, în funcție de tipul antigenic), dar rezistentă la aciditatea gastrică și la acțiunea enzimelor proteolitice.

Izolarea bacilului botulinic în culturi pure se efectuează după metoda obișnuită de izolare și identificare a clostridiilor. Toxina poate fi depistată prin proba biologică pe șoareci albi. La o pereche se injectează intravenos sau intraperitoneal 0,7—1 ml de cultură sau extract din alimentul suspect. Altă pereche se injectează cu materialul de examinat în amestec cu serul polyvalent. Observarea durează până la 4 zile. Dacă prima pereche de șoareci moare, atunci se efectuează proba pe 5 perechi de șoareci, utilizând seruri antitoxice monospecifice.

67.3. MICOTOXICOZELE

Micotoxicozele sunt otrăviri alimentare produse de substanțe toxice secretate de unele mucegaiuri multiplicat într-un aliment. Aceste substanțe se numesc micotoxine. Din alimente și din nutrețuri pentru animale au fost izolate mai mult de 200 specii de fungi și identificate câteva zeci de micotoxine. Aceste toxine pot fi depistate și în carne, lapte, ouă, unde se concentrează când animalele și păsările sunt alimentate cu nutrețuri în care s-au concentrat micotoxine.

Temperatura optimă pentru dezvoltarea fungilor este de 25—28°C.

Din grupul micotoxicozelor sunt cunoscute aflatoxicoza, fusariotoxicoza, ergotismul etc.

Aflatoxicoza este o intoxicație cauzată de toxine produse de mucegaiuri ca *Aspergillus flavus* (de aici și denumirea bolii), *Aspergillus parasiticus* și mai rar din genul *Penicillium*. Mai frecvent sunt afectate semințele oleaginoase cum sunt unele soiuri de nuci, semințe de bumbac, migdale, porumb ș. a. Perioada de după recoltare creează condiții optime de temperatură și umiditate pentru dezvoltarea fungilor și concentrarea aflatoxinei.

Se deosebesc mai multe tipuri de aflatoxine: B1, B2, C1, C2, M1, M2, B2a, C2a. Mai toxică este toxina B1. Toate aflatoxinele au o puternică acțiune hepatotoxică și hepatocarcinogenă.

Diagnosticul se bazează pe depistarea și identificarea mucegaiurilor. Depistarea

aflatoxinei se face prin inoculare în ouă embrionate de găină. Determină moartea embrionului.

Fusariotoxicoza se declanșează după consumul pâinii și produselor de panificație pregătite din grâu afectat de ciuperca *Fusarium graminearum*. Mai frecvent este afectată secara, mai rar grâul și orzul. Boala evoluează cu diaree și semne de afectare a sistemului nervos central.

Ergotismul apare când se utilizează în alimentație făină pregătită din grăunțe afectate de *Claviceps purpurea* (secară cornută). Toxina determină gastroenterită și afectarea sistemului nervos central (convulsii ș. a.).

67.4. EXAMENUL MICROBIOLOGIC COMPLEX ÎN CAZUL OTRĂVIRILOR ALIMENTARE

67.4.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor

Se recoltează probe în borcane sterile cu dopuri șlefuite. Carnea în cantitate de 500 g trebuie recoltată din diferite părți, inclusiv ganglioni limfatici, oase tubulare, sânge din cord, bilă, conținut intestinal. Cadavrele de păsări se recoltează întregi; peștele mărunt câte 2—3 bucăți, iar de la peștele mai mare se taie segmente din partea caudală și din vecinătatea capului. Din produsele lichide și semilichide, după omogenizare, se recoltează volume de 200 g (ml); din preparatele pentru felul II se recoltează 1—2 porții. Voma și lichidul de spălătură gastrică, în volum de 50—100 ml, se recoltează până la administrarea medicației. Se mai recoltează 5—10 g de fecale și 10 ml sânge din vena cubitală.

Materialul recoltat se sigilează și se expediază imediat la laborator. Conservarea probelor la 4—6°C nu trebuie să depășească 24 ore.

Pregătirea probelor. Se fărâmițează 25—30 g de produs într-un mojar steril cu o cantitate mică de apă peptonată 0,1%. Produsele lichide se însămânțează fără prelucrare prealabilă. Alimentele cu reacție acidă și lichidul de spălătură gastrică se neutralizează până la pH 7,2—7,4 cu soluție 10% bicarbonat de sodiu.

Crema, untul și înghețata se topesc la 43—45°C. Materiile fecale se amestecă cu soluție salină izotonă în proporție de 1:10.

67.4.2. Criteriile semnificației etiologice

Diagnosticul otrăvirilor alimentare se bazează pe anumite criterii:

1. O contaminare masivă cu bacterii a alimentului ($\geq 10^5$ raportată la 1 g de produs) cu izolarea repetată a aceluiași agent de la bolnav.
2. Identitatea markerilor epidemiologici (biovar, serovar, fagovar, antibiograma) la tulpinile izolate de la bolnavi și din alimentul suspect.
3. Creșterea semnificativă a titrului de anticorpi în serul bolnavilor față de tulpina microbiană suspectată (autoserodiagnostic).
4. Depistarea exotoxinei prin proba biologică sau prin RHAI.
5. Confruntarea datelor de laborator cu cele epidemiologice și evoluția bolii.

67.4.3. Analiza produselor alimentare

Din materialul examinat se pregătesc diluții decimale succesive de la 10^{-1} până la 10^{-8} .

Produsul nediluat se însămânțează în medii de îmbogățire (mediul «M», Müller-Kauffmann) și, paralel, pe plăci cu mediile Endo, Levine, Ploskirev, Wilson-Blaire. Toate mediile însămânțate se incubează 24 ore la 37°C . Izolarea în cultura pură și identificarea se efectuează după schemele uzuale pentru familia *Enterobacteriaceae*.

Depistarea germenilor din genul *Proteus* se face însămânțând câte 0,1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-6} în apa de condensare a pantei de geloză după metoda Schukevici.

Escherichia coli se pune în evidență însămânțând câte 1 ml din aceleași diluții în eprubete cu câte 5 ml mediu Kessler. După 24 ore de incubare la 37°C , se repică din fiecare eprubetă câte 0,1 ml pe mediul Endo.

S. aureus se depistează prin însămânțarea a câte 1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-8} în eprubete cu 10 ml bulion peptonat cu 6,5% și 10% clorură de sodiu. Câte 0,1 ml din aceleași diluții se însămânțează pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou.

E. faecalis se evidențiază însămânțând câte 0,1 ml din diluțiile 10^{-1} până la 10^{-7} în mediul Slanetz-Bartley.

C. perfringens se depistează prin pipetarea în cutii Petri sterile a câte 0,1 ml din toate diluțiile, peste care se toarnă imediat și se omogenizează câte 8—9 ml mediu Wilson-Blaire. După solidificare se toarnă al doilea strat din 5—7 ml geloză «flămândă» (fără peptonă). Culturile obținute se identifică după schema uzuală.

67.4.4. Analiza materialului de la bolnav

La început se însămânțează direct probele pe plăci cu mediile Endo, Levine, Ploskirev, Wilson-Blaire, geloză hiperclorurată cu lapte și ou.

Pentru depistarea salmonelelor pot fi utile hemoculturi cu însămânțarea a 10 ml sânge în 100 ml bulion biliat sau mediul Rappoport; bila se însămânțează în proporție de 1:10 în bulion peptonat; materiile fecale, voma, lichidul de spălătură gastrică, urina se însămânțează în medii de îmbogățire (mediul «M», Müller-Kauffmann).

Utilizând medii de cultură selective și metodele descrise în capitolele anterioare, putem izola și identifica *B. cereus*, *E. faecalis* sau *C. perfringens*.

CONTROLUL BACTERIOLOGIC SANITAR AL INSTITUȚIILOR MEDICALE, DE COPII ȘI ÎNTREPRINDERILOR DE ALIMENTAȚIE PUBLICĂ

68.1. DATE GENERALE

Utilajul și obiectele de uz curent din instituțiile medicale, de copii și din întreprinderile de alimentație publică sunt frecvent principalele căi de transmitere a unor boli infecțioase bacteriene sau virale. Contaminarea cu microorganisme patogene a veselei, jucăriilor, mobilierului, lenjeriei este intensivă în prezența bolnavilor infecțioși și a purtătorilor.

În creșe și grădinițe de copii transmiterea agenților infecțioși este favorizată și de unele particularități legate de vârsta copiilor (e. g. deprinderi insuficiente de igienă personală, obiceiul de a lua în gură jucăriile și diferite obiecte).

Sursa principală de contaminare a obiectelor de uz curent este omul, care, cu excrețiile lui ca fecalele, urina sau secrețiile rinofaringiene, elimină diferite bacterii patogene și virusuri cum sunt: shigele, salmonelle, *E. coli*, virusurile poliomielitei, hepatitei A ș.a. Astfel transmiterea bolilor infecțioase poate avea loc, practic, prin orice obiect: veselă, jucării, mânerulele ușilor, receptorul telefonului, balustrada scării ș. a. Agenții multor boli pot fi transportați de muște, care îi depun pe obiectele de uz curent și alimente. Obiectele se pot impurifica și cu microorganismele din aer, care sedimentează pe obiecte o dată cu praful și aerosolii. Sursă de impurificare pot fi, de asemenea, apa și solul.

Infectarea omului depinde de concentrația microorganismelor pe obiecte, de virulență și de termenul de supraviețuire a lor în mediu. Pe obiecte microorganismele, de regulă, nu se înmulțesc. După contaminarea obiectelor majoritatea microorganismelor patogene mor relativ repede din cauza uscării sau a acțiunii razelor solare, însă în unele locuri ascunse, cum ar fi diferite crăpături, falduri, adâncituri, microbii pot supraviețui timp mai îndelungat. Durata supraviețuirii variază cu specia microorganismului patogen: e. g. agenții febrei tifoparatifoidice rămân viabili pe obiecte 60—80 zile, *E. coli* până la o lună, corinebacteriile până la 5 luni, micobacteriile tuberculozei până la un an, virusurile ECHO, Coxsackie mai mult de o lună, virusurile gripale o săptămână etc. Sporii persistă deosebit de mult timp.

În transmiterea infecțiilor intraspitalicești o importanță deosebită o au obiectele de uz curent.

Infecțiile intraspitalicești sau infecțiile nozocomiale (de la gr. *nosos* = boală și *komizein* = a îngriji; referitor la spitale) sunt boli infecțioase contractate după internarea bolnavului în spital. În aceste infecții, foarte frecvente, personalul, bolnavii și mediul spitalicesc constituie un ansamblu indivizibil. Infecțiile nozocomiale sunt cauzate de așa-numitele tulpini de spital, care de regulă sunt foarte rezistente, inclusiv la antibiotice. De aici decurge dificultatea tratamentului lor. Apariția infecțiilor intraspitalicești este favorizată de mai mulți factori cum sunt: boala principală a bolnavului, vârsta, explorări

agresive (cateterisme etc.), intervenții chirurgicale, medicație imunosupresivă, alimentație, durata spitalizării ș. a.

Cauză mai frecventă a infecțiilor intraspitalicești sunt: coci grampozitivi (*S. aureus*, streptococi din grupul A); bacili gramnegativi (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) și alte microorganisme (virusurile hepatitei, virusurile gripale, virusul rujeolei etc.).

Scopurile analizei microbiologice sanitare a obiectelor de uz curent și a utilajului sunt diferite:

- controlul igienico-sanitar curent în instituțiile curative, de copii și în întreprinderile alimentației publice;

- controlul sanitar preventiv;

- la indicații epidemiologice, investigarea focarelor de boli infecțioase acute.

Obiectivele examenului microbiologic sanitar sunt:

1. Mobilierul, îmbrăcămintea, lenjeria, păturile, cuverturile, vesela, tacămurile, paharele, tablele pentru prepararea alimentelor etc.

2. Pereții, dușumeaua, pervazul ferestrelor, mânerul ușilor, mesele pentru alimentare și cele pentru infășat.

3. În spitale: aerul, utilajul, instrumentele, materialul de sutură, mâinile chirurgilor și ale personalului auxiliar, pielea câmpului operator.

4. În maternități: laptele de mamă, soluția de glucoză utilizată ca băutură pentru nou-născuți, unguentul cu vaselină, obiectele pentru toaleta nou-născuților, apa potabilă din sticle, cămile, personalul medical și auxiliar.

5. În farmacii: apa distilată, soluții injectabile, unguente, coliruri, pulberi, comprimate, infuzii, decocturi și siropuri, mesele, flacoanele și dopurile, aerul din încăperi, robinetele, personalul etc.

În cazul unui control sanitar curent examinările se fac lunar. La indicații epidemiologice examinările se fac până la și după efectuarea măsurilor sanitaro-igienice. Controlul sterilității instrumentelor, câmpului operator, materialului de pansament, lenjeriei chirurgicale și a mâinilor chirurgilor se face săptămânal.

68.2. EFECTUAREA EXAMINĂRILOR

68.2.1. Recoltarea și pregătirea probelor

Pentru analiza microbiologică sanitară probele de pe obiecte se recoltează cu ajutorul tampoanelor de vată, prin metoda amprentelor, uneori prin metoda incluzionării.

- *Metoda tampoanelor.* Se utilizeazăampoane sterile din vată răsucită la capătul unei tije de lemn și introduse în eprubete. Capătul opus al tijeii iese prin dopul de vată. Eprubetele conțin 5 ml soluție salină izotonă sterilă sau mediul Kessler. Cu tamponul umezit, se șterge suprafața examinată în două direcții reciproc perpendiculare.

Pentru recoltarea probelor de pe suprafața meselor, dușumelei, pervazului ferestrelor se folosesc șabloane metalice cu suprafața de 100 cm².

Mâinile se șterg cu tamponul umezit începând cu partea dorsală, mai puțin contaminată, și continuând cu suprafața palmară, spațiile interdigitale, pliurile periungchiale.

Obiectele mici (jucăriile, tacâmurile) se șterg cu tamponul pe toată suprafața.

Farfuriile, cămile, paharele se șterg pe toată suprafața interioară, margine și suprafața exterioară pe o lățime de 2 cm.

Prin exprimarea tamponelor în fluidul tuburilor se obține lichidul de spălătură a suprafețelor respective.

La examinarea flacoanelor și dopurilor din farmacia se recoltează lichidul de spălătură.

■ *Metoda amprentelor (de contact)*. Se utilizează benzi din hârtie de filtru sau membrane filtrante sterile, care se introduc în medii cu 3% geloză lichefiată, geloză-sânge, geloză glucozată, mediul Endo ș. a. După solidificare se aplică pe suprafața examinată, se apasă puțin cu o pensă sterilă, iar după câteva minute se transferă într-o cutie Petri sterilă cu suprafața amprentei în sus, după care se incubează în termostat.

■ *Metoda incluzionării*. Se folosește o formă metalică specială cu aspectul unui trunchi de con, la care suprafața superioară are 5 cm², iar cea inferioară 4 cm². După flambare cu alcool și răcire, folosind o pensă sterilă, se aplică forma pe suprafața examinată și se umple cu 6—7 ml mediu agarizat 4% (geloză, mediul Endo) topit și răcit la 45°C. Se apasă conul pe suprafața examinată până la solidificarea mediului: 5—6 minute geloză, 9—10 minute mediul Endo. În final se ridică forma, se desprinde și se plasează mediul de cultură într-o cutie Petri sterilă.

68.2.2. Analiza

În instituțiile medicale (cu excepția blocurilor alimentare), maternități, farmacii lichidul de spălătură recoltat cu un singur tampon de pe fiecare suprafață investigată se folosește pentru toate analizele.

S. aureus îl depistăm prin însămânțarea directă a 0,2—0,3 ml lichid în 5 ml de bulion cu 6,5% clorură de sodiu și pe o placă de geloză hiperclorurată cu gălbenuș de ou. După obținerea culturii pure se identifică. Pentru aceasta se testează coagulaza, fermentarea manitei, lecitinaza. În scopuri epidemiologice se determină fagovarul.

Coliformii se determină introducând tamponul într-o eprubetă cu 5 ml mediu Kessler, care apoi este incubată 24 ore la 37°C. A doua zi se fac repicări din mediul Kessler pe mediul Endo. Pentru identificare, se repică coloniile tipice în mediul semilichid cu glucoză, care este incubat la 43°C.

Pentru depistarea pseudomonadelor nu se fac însămânțări speciale, deoarece coloniile lor pigmentogene pot fi reperate ușor pe mediul Endo. Coloniile suspecte se repică pe geloză înclinată cu 2—5% glicerină sau manită. Pe panta de geloză bacilul picocianic crește abundent cu o nuanță verzuie; cultura are consistență unsuroasă și un miros specific de iasomie. Se verifică aspectul morfotinctorial pe frotiuri colorate Gram și caracterul hemolitic prin repicare pe plăci cu geloză-sânge.

Nu se fac însămânțări speciale nici pentru depistarea bacteriilor din genul *Proteus*. Coloniile suspecte de pe mediul Endo se repică, după Schukevici, în apa de condens a pantei de geloză și, după 24 ore la 37°C, se examinează caracterul creșterii, mobilitatea, producerea de urează, fenilalanindezaminază și alte caractere biochimice.

Obiectele sunt considerate curate, dacă numărul total de microorganisme nu depășește 10⁴ la 1 cm² în lipsa patogenilor.

CONTROLUL CALITĂȚII DEZINFECȚIEI ȘI STERILIZĂRII

Calitatea dezinfecției se controlează în 10—20% din focarele prelucrate de Centrul de Dezinfecție sau Centrul de Igienă și Epidemiologie. Se studiază toate focarele bolnavilor cu dizenterie cronică și focarele unde sunt purtători ai agenților febrilor tifoparatifoide până la scoaterea lor din evidență.

Se examinează lichidul de spălătură recoltat de pe obiectele care joacă rol în transmiterea infecției. Spălăturile se efectuează până la 30—40 minute după dezinfecție. Când pentru dezinfecție au fost utilizate substanțe care conțin clor, se umezește tamponul cu soluție 1% de hiposulfid. La utilizarea lizolului și altor substanțe se umezește tamponul numai cu apă de robinet sterilă.

Dezinfecția este considerată suficientă, dacă în toate probele lipsește creșterea coliformilor și a *S. aureus*.

În spitale, maternități se efectuează controlul sterilității instrumentelor chirurgicale, seringilor, acelor, materialului pentru pansament și sutură, sistemelor de transfuzie, mâinilor chirurgilor, pielii câmpului operator, completelor de toaletă a nou-născuților, pipetelor, picurătoarelor oftalmice, laptelui de mamă, soluțiilor pentru băut, unguentelor pentru nou-născuți.

Pentru controlul sterilității se utilizează ca medii de cultură, paralel, bulionul glucozat Hottinger (cu 0,5 sau 1% glucoză), mediul tioglicolic (hidrolizat de cazeină, cistină, glucoză, acid tioglicolic, apă distilată, NaCl), bulionul Sabouraud (apă distilată, peptonă, 4% maltoză sau glucoză, pH 5,7).

De pe obiectele cu dimensiuni mari facem spălături.

Instrumentele chirurgicale se introduc cu totul în mediile enumerate mai sus. Seringile se introduc demontate: cilindrul, pistonul, acele. Însămânțările se păstrează 14 zile la 37°, iar mediul Sabouraud la 20—22°C.

Materialul de pansament se selectează din diferite sectoare ale casoletei și se introduce fiecare probă în câte două eprubete cu toate mediile indicate. Materialele de dimensiuni mici se introduc cu totul, din cele mari se taie bucăți.

Catgutul (se păstrează în iod) în prealabil se spală de iod introducând ghemul în soluție 10% hiposulfid de sodiu sterilă, în care se mențin 24 ore la temperatura camerei, apoi încă 24 ore în apă distilată sterilă. Ulterior se taie fragmente într-o cutie Petri sterilă și câte 4—5 bucăți se introduc în câte două eprubete cu medii de cultură.

Mătasea chirurgicală (se păstrează în alcool) se introduce și se menține 24 ore în apă distilată sterilă, apoi se procedează ca și cu catgutul.

Pentru controlul pielii câmpului operator se efectuează spălături cu un șervețel steril 5×5 cm imbibat cu soluție salină izotonă. Șervețelul se introduce într-un balon cu aceeași soluție sau cu apă distilată sterilă și perle de sticlă, și se agită 10 minute, apoi se pipetează câte 0,5 ml în două cutii Petri sterile în care se toarnă și se omogenizează imediat geloză topită și răcită la 45°C . Șervețelul se însămânțează în bulion glucozat 0,5% cu incubare 48 ore la 37°C .

Obiectele se consideră sterile, dacă lipsește creșterea microorganismelor în toate mediile de cultură.

Bibliografie

- Baisden C. R., *The Office Practice Laboratory*, Aspen Publication, Rockville, 1985.
- British Society for Antimicrobial Chemotherapy: A Guide to Sensitivity Testing*, Academic Press, London, 1991.
- Bălbăe V., Pozsgi N., *Bacteriologie Medicală*, Editura Medicală, București, vol. I și II, 1984, 1985.
- Brooks G. F., Butel J. S., Ornston L. N., *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, 9-th edition. Prentice-Hall International Inc., London, 1991.
- Buluc D., *Microbiologie Medicală*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1992.
- Collins C. H., Lyne P. M., Grange J. M., *Collins & Lyne's Microbiological Methods*, 6-th edition. Butterworth & Heinemann, Oxford, 1991.
- Compendiu pentru lucrări practice la microbiologia medicală și diagnosticul de laborator al bolilor infecțioase* / Sub redacția prof. Krivoșein, Lumina, Chișinău, 1990.
- Gruickshank R., Duguld J. P., Marmion B. P., Swain R. H. A., *Medical Microbiology*, vol. II: *The Practice of Medical Microbiology*, 12-th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1975.
- Mims C. A., Playfair J. H. L., Roitt I. M., Wakelin D., Williams R., Anderson R. M., *Medical Microbiology*. Mosby, St. Louis, 1993.
- Mănescu Sergiu, *Microbiologia sanitară*, Editura Medicală, București, 1989
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 4-th edition; Approved Standard M2-A4. NCCLS, Villanova, PA, 1990a.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 2-nd edition; Approved Standard M7-A2, NCCLS, Villanova, PA, 1990b.
- Parker T. M., Collier L. H., *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 8-th edition, vol. II, Edward Arnold, London, 1990.
- Piatkin K., Krivoșein Iu., *Microbiologie*, Lumina, Chișinău, 1993.
- Schaffler A., Alfakruger I., *Microbiologie medicală și imunologie*, Editura ALL, București, 1994
- Sneath P. A. H., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- WHO: Laboratory Biosafety Manual*, World Health Organization, Geneva, 1983.
- Zarnea G., *Tratat de Microbiologie Generală*. Editura Academiei Române, București, vol. V, 1994.
- Букринская А., Т., *Вирусология*, Медицина, Москва, 1986.
- Кочемасова Э. Н., Ефремова С. А., Рыбакова А. М., *Санитарная микробиология и вирусология*, Медицина, Москва, 1987.

CUPRINS

Partea întâi

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

1. LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE	4
1.1. Planul laboratorului	4
1.1.1. Planul de ansamblu	4
1.1.2. Planul principalelor compartimente	5
1.2. Construcția și instalațiile	6
1.3. Mobilierul	7
1.4. Echipamentul	7
1.4.1. Microscopae și lupe	7
1.4.2. Incubatoare, băi de apă sau de nisip	7
1.4.3. Refrigeratoare	9
1.4.4. Centrifuge	9
1.4.5. Balanțe	10
1.4.6. Omogenizatoare, agitatoare, dispozitive de triturare a țesuturilor și rupere a celulelor	10
1.4.7. Aparate pentru distilarea apei	10
1.4.8. Distribuitoare pentru medii de cultură	10
1.4.9. Containere pentru materialul contaminat	11
1.4.10. Aparatură și dispozitive pentru sterilizare și dezinfecție	11
1.4.11. Incinte de siguranță microbiologică	11
1.4.12. Echipament din sticlă, plastic și articole mici de laborator	11
1.5. Reguli de comportare și regimul antiepidemic	14
1.5.1. Clasificarea microorganismelor în funcție de riscul infecțios	14
1.5.2. Căi de transmitere și porți de intrare în organism ale infecțiilor de laborator	15
1.5.3. Clasificarea laboratoarelor în funcție de exigența siguranței antiinfecțioase	16
1.5.4. Barierele antiinfecțioase	17
1.5.5. Incintele de protecție microbiologică	18
1.5.6. Regimul substanțelor toxice, corozive și inflamabile	20
1.5.7. Aspecte organizatorice	20
2. STERILIZAREA, DEZINFECȚIA ȘI CONSERVAREA	21
2.1. Sterilizarea	21
2.1.1. Sterilizări prin căldură uscată	21
2.1.2. Sterilizări prin căldură umedă	22
2.1.3. Filtrarea	27
2.1.4. Sterilizarea chimică	27
2.1.5. Controlul eficienței sterilizării	27
2.1.6. Prezervarea sterilității materialelor	29

2.2. Dezinfecția	29
2.2.1. Precauții privind siguranța dezinfecției chimice	29
2.2.2. Dezinfecțante uzuale în laboratoarele de microbiologie	32
2.3. Decontaminarea și circuitul materialelor în laboratorul de microbiologie	34
2.3.1. Colectarea materialelor contaminate	35
2.3.2. Tratarea materialelor pentru reutilizare sau dezafectare	35
2.4. Conservarea	37
2.4.1. Conservarea prin agenți fizici	37
2.4.2. Conservarea chimică	38
2.5. Asepsia în microbiologie	39
3. METODELE MICROBIOLOGICE DE DIAGNOSTIC	
3.1. Recoltarea, conservarea și transportul materialului examinat	40
3.1.1. Alegerea prelevatelor patologice	40
3.1.2. Norme de bază pentru prelevarea probelor destinate examenului microbiologic	41
3.1.3. Recipiente și instrumente	41
3.1.4. Transportul și conservarea probelor	43
3.1.5. Tehnici de prelevare (în ordine alfabetică)	43
3.2. Tehnici pentru depistarea și identificarea microorganismelor	49
3.2.1. Examenul macroscopic	50
3.2.2. Microscopia	50
3.2.3. Izolarea	51
3.2.4. Identificarea	51
3.2.4.1. Cultura pură	51
3.2.4.2. Studiul și numirea izolatelor	52
3.2.4.3. Markerii de tulpină, infraspecifici	53
4. MORFOLOGIA ȘI ULTRASTRUCTURA BACTERIILOR.	
METODA MICROSCOPICĂ DE EXAMINARE	54
4.1. Microscopul optic, recapitulări indispensabile	54
4.1.1. Definiție și principiul de funcționare	54
4.1.2. Descrierea microscopului optic	54
4.2. Microscopia optică pe câmp luminos, metoda uzuală	58
4.2.1. Pregătirea microscopului	58
4.2.2. Întreținerea microscopului	59
4.2.3. Dificultăți frecvente în microscopie	59
4.2.4. Examenul între lamă și lamelă la microscopul cu câmp luminos	60
4.2.5. Preparate microscopice colorate	61
4.3. Metode speciale de microscopie optică	67
4.3.1. Microscopia cu fond negru	67
4.3.2. Microscopia cu contrast de fază	68
4.3.3. Microscopia cu fluorescență	70
4.4. Microscopia electronică	72
4.4.1. Microscopia electronică cu transmisie	73
4.4.2. Microscopia electronică cu baleaj	74
5. METODA BACTERIOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC	75
5.1. Mediile de cultură și clasificarea lor	75
5.1.1. Clasificarea după proveniența nutrienților	75

5.1.2. Clasificarea după consistență	76
5.1.3. Clasificarea după compoziție	76
5.2. Tehnica însămânțării	77
5.2.1. Epuizarea semcantitativă a inoculului pe suprafața plăcilor Petri	77
5.2.2. Etalarea uniformă a inoculului pe plăci Petri	78
5.2.3. Însămânțarea pantei de agar nutritiv	79
5.2.4. Însămânțarea coloanei de agar nutritiv moale	79
5.2.5. Însămânțarea recipientelor cu mediu de cultură lichid	79
5.2.6. Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate	79
5.3. Incubarea culturilor	79
5.4. Studiul caracterelor de cultură	81
6. INTERACȚIUNI NEGATIVE ÎNTRE POPULAȚIILE MICROBIENE	83
6.1. Competiția	83
6.2. Amensalismul	84
6.3. Antibioza	84
6.4. Parazitismul și prădarea	85
7. ROLUL LABORATORULUI ÎN ÎNȚIEREA TERAPIEI ANTIMICROBIENE	86
7.1. Relațiile microb—medicament antimicrobian. Definirea categoriilor de sensibilitate	86
7.2. Țintirea etapizată a terapiei antimicrobiene	87
7.3. Antiblograma cantitativă: metoda diluțiilor	89
7.4. Antiblograma difuzimetrică	92
7.5. Deplatarea β -lactamazelor	99
7.6. Teste de laborator pentru monitorizarea terapiei antimicrobiene	100
7.6.1. Determinarea nivelului de eficiență inhibitoare (NEI) a umorilor	100
7.6.2. Dozarea antibioticelor în umori	101
7.6.3. Metode rapide	101
8. BACTERIOFAGI ȘI BACTERIOCINE	103
8.1. Bacteriofagi și bacteriofagie	103
8.1.1. Date generale	103
8.1.2. Metode de izolare a bacteriofagilor	103
8.1.3. Metode de indicare a bacteriofagului. Indicarea fagului virulent	105
8.1.4. Titrarea bacteriofagului	105
8.1.5. Aplicații practice ale bacteriofagiei	106
8.2. Bacteriocine	107
9. METODA BIOLOGICĂ (EXPERIMENTALĂ) DE DIAGNOSTIC	109
9.1. Aspecte generale	109
9.2. Conțințunea animalelor de laborator	112
9.3. Puncții și inoculări	112
9.3.1. Injectarea intradermică	113
9.3.2. Inocularea percutană, prin scarificare	113
9.3.3. Injectarea subcutanată	113
9.3.4. Injectarea intramusculară	114
9.3.5. Injectarea intraperitoneală	114
9.3.6. Injectarea intravenoasă	114
9.3.7. Inoculări oculare	115

9.3.8. Injectarea intracerebrală	115
9.3.9. Injectarea șoricelilor sugari	115
9.4. Marcarea	115
9.5. Supravegherea animalelor inoculate	115
9.5.1. Termometrizarea	116
9.5.2. Prelevări de sânge	116
9.6. Sacrificarea	116
9.7. Necropsia	117
10. METODA IMUNOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC	119
10.1. Factorii rezistenței naturale a organismului: fagocitoza, complementul, lizozimul	119
10.1.1. Explorarea unor funcții fagocitare	119
10.1.2. Explorarea sistemului complement	123
10.1.3. Dozarea difuzimetrică a lizozimului în umori	125
10.2. Reacții serologice	126
10.2.1. Interacțiunile primare și secundare în reacțiile antigen-anticorp	126
10.2.2. Aplicații practice ale reacțiilor antigen-anticorp	127
10.2.3. Depistarea imunodeficiențelor umorale: hipo- și agamaglobulinemia	134
10.3. Reacțiile imunității celulare	134
10.3.1. Testări <i>in vivo</i>	135
10.3.2. Testări <i>in vitro</i>	136
11. ALERGENII ȘI METODA ALERGOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC	138
11.1. Testări <i>in vivo</i> : Intradermoreacții la alergeni	143
11.2. Teste <i>in vitro</i>	145
11.2.1. Testul radioimunisorbentului (RIST)	145
11.2.2. Testul radioalergosorbentului (RAST)	145
11.2.3. Testul Schultz-Dale	145
12. VACCINURILE. AUTOVACCINURI. METODE DE OBTINERE	146
12.1. Tipuri de vaccinuri	146
12.1.1. Vaccinurile vii atenuate	146
12.1.2. Vaccinurile omorâte	147
12.1.3. Vaccinurile cu componente microbiene purificate	148
12.1.4. Antigeni vaccinanți, produși prin inginerie genetică sau sinteză polipeptidică	148
12.2. Indicațiile vaccinării	148
12.3. Complicațiile vaccinărilor	149
12.4. Contraindicațiile vaccinărilor	149
12.5. Autovaccinul	152
12.5.1. Metoda de preparare	152
13. SERURILE DIAGNOSTICE ȘI CURATIVE (PROFILACTICE)	155
13.1. Serurile diagnostice	155
13.1.1. Serurile imune native, monospecifice și polivalente	155
13.2. Seruri hiperimune curative (profilactice)	156
14. MICROFLORA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN	157
14.1. Contaminarea microbiană, o constantă a mediului ambiant	157
14.2. Colonizarea microbiană normală	157
14.3. Microbiocenozele organismului	158

14.4. Rolul fiziologic al microflorei indigene	162
14.4.1. Rolul nutritiv	162
14.4.2. Rolul protector	162
14.4.3. Efecte negative	162
14.4.4. Microorganismele probiotice	162
14.5. Dismicrobismul	163

Partea a doua

BACTERIOLOGIE ȘI MICOLOGIE SPECIALĂ

15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STAFILOCOCICE	165
15.1. Date generale	165
15.1.1. O minidefiniție	165
15.1.2. Repere taxonomice	165
15.1.3. Habitat	166
15.1.4. Factori de patogenitate	166
15.1.5. Receptivitatea la stafilococi	167
15.1.6. Infecțiile stafilococice	167
15.2. Investigația etiologică a infecțiilor stafilococice	168
15.2.1. Diagnosticul microbiologic	168
15.2.2. Diagnosticul serologic	170
15.2.3. Investigarea epidemiologică a infecțiilor stafilococice nozocomiale	170
15.2.4. Biopreparate și antibiotice pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul stafilococilor	170
16. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STREPTOCOCICE	171
16.1. Date generale	171
16.1.1. O minidefiniție	171
16.1.2. Repere taxonomice	171
16.1.3. Factori de patogenitate	172
16.1.4. Receptivitatea la infecțiile streptococice	173
16.1.5. Infecții și boli streptococice	173
16.2. Investigația etiologică a infecțiilor streptococice	174
16.2.1. Diagnosticul microbiologic	174
16.2.2. Diagnosticul imunologic	176
16.2.3. Biopreparate și antibiotice pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul infecțiilor streptococice	178
16.3. Investigația etiologică a infecțiilor pneumococice	178
16.3.1. Diagnosticul microbiologic	178
16.3.2. Biopreparate și antibiotice folosite pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și terapia infecțiilor pneumococice	179
17. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE NEISSERII	180
17.1. Date generale	180
17.1.1. O minidefiniție	180
17.1.2. Repere taxonomice	180
17.2. <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	180
17.2.1. Date generale	180

17.2.1.1. Habitat	180
17.2.1.2. Factori de patogenitate	181
17.2.1.3. Receptivitatea la infecțiile meningococice	181
17.2.1.4. Infecțiile meningococice	181
17.2.2. Investigația etiologică a infecțiilor meningococice	181
17.2.2.1. Diagnosticul microbiologic	181
17.2.2.2. Diagnosticul serologic	184
17.2.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul infecțiilor meningococice	184
17.3. <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	184
17.3.1. Date generale	184
17.3.1.1. Habitat	184
17.3.1.2. Factori de patogenitate	185
17.3.1.3. Receptivitatea la infecțiile gonococice	185
17.3.1.4. Infecțiile gonococice	185
17.3.2. Investigația etiologică a infecțiilor gonococice	185
17.3.2.1. Diagnosticul microbiologic	185
17.3.2.2. Diagnosticul serologic	187
17.3.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul infecțiilor gonococice	187
18. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BRUCELOZEI	188
18.1. Date generale	188
18.1.1. O minidefiniție	188
18.1.2. Repere taxonomice	188
18.1.3. Habitat	188
18.1.4. Factori de patogenitate	188
18.1.5. Receptivitatea la infecție	188
18.1.6. Bruceloză umană	189
18.2. Investigația etiologică în bruceloză	189
18.2.1. Diagnosticul microbiologic	189
18.2.2. Diagnosticul imunologic	191
18.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul brucelozel	193
19. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TULAREMIEI	194
19.1. Date generale	194
19.1.1. O minidefiniție	194
19.1.2. Repere taxonomice	194
19.1.3. Habitat	194
19.1.4. Factori de patogenitate	195
19.1.5. Receptivitatea la tularemie	195
19.1.6. Tularemia	195
19.2. Investigația etiologică a tularemiei	195
19.2.1. Diagnosticul microbiologic	195
19.2.2. Diagnosticul indirect	196
19.2.3. Biopreparate folosite pentru diagnosticul și profilaxia tularemiei	197
20. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL YERSINIOZELOR	198
20.1. Date generale	198
20.1.1. O minidefiniție	198

20.1.2. Repere taxonomice	198
20.1.3. Habitat	198
20.1.4. Factori de patogenitate	199
20.1.5. Receptivitatea la infecția cu yersinii	199
20.1.6. Yersiniozele	199
20.2. Investigația etiologică a pestei	200
20.2.1. Diagnosticul microbiologic	200
20.2.2. Diagnosticul serologic	202
20.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul și profilaxia pestei	202
20.3. Investigația etiologică în alte yersinioze	202
21. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ANTRAXULUI ȘI INFECȚIILOR CU BACILI ANTRACOIZI	203
21.1. Date generale	203
21.1.1. O minidefiniție	203
21.1.2. Repere taxonomice	203
21.1.3. Habitat	203
21.1.4. Factori de patogenitate	203
21.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu <i>Bacillus</i>	204
21.1.6. Infecțiile determinate de speciile genului <i>Bacillus</i>	204
21.2. Investigația etiologică a infecțiilor determinate de specii din genul <i>Bacillus</i>	205
21.2.1. Diagnosticul microbiologic	205
21.2.2. Diagnosticul prin metode imunologice	207
21.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul, profilaxia și tratamentul specific al antraxului	207
22. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CLOSTRIDIENE	208
22.1. Date generale	208
22.1.1. O minidefiniție	208
22.1.2. Repere taxonomice	208
22.1.3. Habitat	208
22.1.4. Factori de patogenitate	209
22.1.5. Receptivitatea la infecțiile clostridiene	209
22.1.6. Bolile clostridiale	210
22.2. Investigația etiologică a gangrenei gazoase	211
22.2.1. Diagnosticul microbiologic	211
22.2.2. Metoda rapidă de depistare a <i>C. perfringens</i>	213
22.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul, tratamentul și profilaxia gangrenei gazoase	213
22.3. Investigația etiologică a toxinfecțiilor alimentare, cauzate de <i>C. perfringens</i>	214
22.4. Investigația etiologică în tetanos	214
22.5. Investigația etiologică a botulismului	215
23. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE BACTERII ANAEROBE NECLOSTRIDIENE	216
23.1. Date generale	216
23.1.1. O minidefiniție	216
23.1.2. Repere taxonomice	216
23.1.3. Habitat	218
23.1.4. Factori de patogenitate	218

23.1.5. Receptivitatea la infecții cu bacteriile florei endogene Veillon	219
23.1.6. Infecțiile determinate de bacteriile florei endogene Veillon	219
23.2. Investigația etiologică a infecțiilor anaerobe necistrodience	220
23.2.1. Diagnosticul microbiologic	220
24. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE HAEMOPHILUS	223
24.1. Date generale	223
24.1.1. O minidefiniție	223
24.1.2. Repere taxonomice	223
24.1.3. Habitat	223
24.1.4. Factori de patogenitate	223
24.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu <i>Haemophilus</i>	224
24.1.6. Infecțiile determinate de bacteriile hemofile	224
24.2. Investigația etiologică în infecțiile cu <i>Haemophilus</i>	224
24.2.1. Diagnosticul microbiologic	224
24.2.2. Metode rapide de diagnostic	226
24.2.3. Biopreparate	226
25. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI	227
25.1. Date generale	227
25.1.1. O minidefiniție	227
25.1.2. Repere taxonomice și habitat	227
25.1.3. Factori de patogenitate	228
25.1.4. Receptivitatea la infecțiile cu corinebacterii	228
25.1.5. Difteria	228
25.2. Investigații de laborator pentru confirmarea difteriei	228
25.2.1. Diagnosticul microbiologic	228
25.2.2. Controlul receptivității la difterie și a eficienței vaccinării	232
25.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul specific al difteriei	232
26. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE	233
26.1. Date generale	233
26.1.1. O minidefiniție	233
26.1.2. Repere taxonomice și habitat	233
26.1.3. Factori de patogenitate	233
26.1.4. Receptivitatea la tusea convulsivă	234
26.1.5. Tusea convulsivă	234
26.2. Investigația etiologică a tusei convulsive	235
26.2.1. Diagnosticul microbiologic	235
26.2.2. Diagnosticul imunologic	236
26.2.3. Biopreparate și medicamente utilizate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul tusei convulsive	237
27. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI ȘI MICOBACTERIOZELOR	238
27.1. Date generale	238
27.1.1. O minidefiniție	238
27.1.2. Repere taxonomice și habitat	238

27.1.3. Factori de patogenitate	238
27.1.4. Receptivitatea la tuberculoză și micobacterioze	239
27.1.5. Infecția tuberculoasă și micobacteriozele	239
27.2. Investigația etiologică în tuberculoză și micobacterioze	240
27.2.1. Diagnosticul microbiologic	240
27.2.2. Diagnosticul imunologic	243
27.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul tuberculozei	244
28. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI	245
28.1. Date generale	245
28.1.1. O minidefiniție	245
28.1.2. Repere taxonomice și habitat	245
28.1.3. Factori de patogenitate	245
28.1.4. Receptivitatea la treponematoze	246
28.1.5. Principalele treponematoze	246
28.2. Investigația etiologică a sifilisului	247
28.2.1. Diagnosticul microbiologic	247
28.2.2. Diagnosticul serologic	248
28.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul de laborator al sifilisului	249
29. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BORRELIOZELOR	250
29.1. Date generale	250
29.1.1. O minidefiniție	250
29.1.2. Repere taxonomice	250
29.1.3. Habitat	250
29.1.4. Factori de patogenitate	251
29.1.5. Receptivitatea la borrelioză	251
29.1.6. Borreliozele	251
29.2. Investigația etiologică în febrele recurente	252
29.3. Investigația etiologică a bolii Lyme	252
30. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR	253
30.1. Date generale	253
30.1.1. O minidefiniție	253
30.1.2. Repere taxonomice	253
30.1.3. Habitat	253
30.1.4. Factori de patogenitate	254
30.1.5. Receptivitatea la leptospiroze	254
30.1.6. Leptospirozele	254
30.2. Investigația etiologică în leptospiroze	254
30.2.1. Diagnosticul microbiologic	254
30.2.2. Diagnosticul serologic	256
30.2.3. Biopreparate folosite pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și terapia leptospirozelor	256
31. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE ENTEROBACTERIACEAE	257
31.1. Date generale	257
31.1.1. O minidefiniție	257

31.1.2. Repere taxonomice și habitat	257
31.2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE <i>ESCHERICHIA</i>	260
31.2.1. Date generale	260
31.2.1.1. O minidefiniție	260
31.2.1.2. Repere taxonomice	260
31.2.1.3. Habitat	261
31.2.1.4. Factori de patogenitate	261
31.2.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu <i>E. coli</i>	262
31.2.1.6. Infecțiile cauzate de <i>E. coli</i>	262
31.2.2. Investigația etiologică a escherichiozelor	263
31.2.2.1. Diagnosticul microbiologic	263
31.2.2.2. Diagnosticul serologic	264
31.2.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și tratamentul escherichiozelor	264
31.3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI BACTERIENE	265
31.3.1. Date generale	265
31.3.1.1. O minidefiniție	265
31.3.1.2. Repere taxonomice	265
31.3.1.3. Habitat	265
31.3.1.4. Factori de patogenitate	265
31.3.1.5. Dizenteria	266
31.3.2. Investigația etiologică a dizenteriei	266
31.3.2.1. Diagnosticul microbiologic	266
31.3.2.2. Diagnosticul serologic	267
31.3.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul, tratamentul și profilaxia dizenteriei	268
31.4. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SALMONELOZELOR	268
31.4.1. Date generale	268
31.4.1.1. O minidefiniție	268
31.4.1.2. Repere taxonomice și nomenclatură	268
31.4.1.3. Habitat	270
31.4.1.4. Factori de patogenitate	270
31.4.1.5. Receptivitatea la salmoneloze	270
31.4.1.6. Salmonelozele	270
31.4.2. Investigația etiologică a salmonelozelor	271
31.4.2.1. Diagnosticul microbiologic	271
31.4.2.2. Diagnosticul serologic	272
31.4.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul și profilaxia febrei tifoparatifoidice	273
31.5. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE ENTEROBACTERII CONDIȚIONAT PATOGENE	273
31.5.1. Date generale	273
31.5.2. Investigația etiologică a infecțiilor cu enterobacterii condiționat patogene	274
32. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI ȘI ALTOR DIAREI VIBRIOGENE	276
32.1. Date generale	276
32.1.1. O minidefiniție	276

32.1.2. Repere taxonomice	276
32.1.3. Habitat	277
32.1.4. Factori de patogenitate	277
32.1.5. Receptivitatea la holeră	278
32.1.6. Infecțiile determinate de vibrioni	278
32.2. Investigația etiologică a holerei	278
32.2.1. Diagnosticul microbiologic	278
32.2.2. Diagnosticul serologic	280
32.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și profilaxia holerei	281
33. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE CAMPILOBACTERII ȘI HELICOBACTERII	282
33.1. Date generale	282
33.1.1. O minidefiniție	282
33.1.2. Repere taxonomice	282
33.1.3. Habitat	283
33.1.4. Factori de patogenitate	283
33.1.5. Receptivitatea la infecții	283
33.1.6. Infecții umane determinate de specii <i>Campylobacter</i> și <i>Helicobacter</i>	284
33.2. Diagnosticul etiologic al enterocolitelor cu <i>C. jejuni</i> și <i>C. coli</i>	284
33.2.1. Diagnosticul bacteriologic	284
33.2.2. Diagnosticul serologic	286
33.3. Diagnosticul gastritelor cu <i>H. pylori</i>	286
33.3.1. Metode invazive	286
33.3.2. Metode neinvazive	287
33.3.3. Biopreparate pentru diagnosticul și tratamentul infecțiilor cu <i>C. jejuni / coli</i> și <i>H. pylori</i>	287
34. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE PSEUDOMONADE	289
34.1. Date generale	289
34.1.1. O minidefiniție	289
34.1.2. Repere taxonomice	289
34.1.3. Habitat	289
34.1.4. Factori de patogenitate	290
34.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu pseudomonade	290
34.1.6. Infecții cu pseudomonade	290
34.2. Investigația etiologică a infecțiilor cu pseudomonade	291
34.2.1. Diagnosticul microbiologic	291
35. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LISTERIOZEI	293
35.1. Date generale	293
35.1.1. O minidefiniție	293
35.1.2. Repere taxonomice	293
35.1.3. Habitat	293
35.1.4. Factori de patogenitate	293
35.1.5. Receptivitatea la listerioze	294

35.1.6. Listeriozele	294
35.2. Investigația etiologică în listerioze	294
35.2.1. Diagnosticul microbiologic	294
35.2.2. Diagnosticul serologic	295
35.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul listeriozel	296
36. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEGIONELOZELOR	297
36.1. Date generale	297
36.1.1. O minidefiniție	297
36.1.2. Repere taxonomice	297
36.1.3. Habitat	297
36.1.4. Factori de patogenitate	297
36.1.5. Receptivitatea la legioneloze	298
36.1.6. Legionelozele	299
36.2. Investigația etiologică a legionelozelor	299
36.2.1. Diagnosticul direct (microbiologic)	299
36.2.2. Diagnosticul serologic	301
36.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul legionelozelor	302
37. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RICKETTSIOZELOR	303
37.1. Date generale	303
37.1.1. O minidefiniție	303
37.1.2. Repere taxonomice	303
37.1.3. Habitat	303
37.1.4. Factori de patogenitate	304
37.1.5. Receptivitatea la rickettsioze	304
37.1.6. Infecții și boli determinate de rickettsii	304
37.2. Investigația etiologică a rickettsiozelor	307
37.2.1. Diagnosticul microbiologic	307
37.2.2. Diagnosticul serologic	308
37.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul rickettsiozelor	309
38. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE CHLAMIDII	311
38.1. Date generale	311
38.1.1. O minidefiniție	311
38.1.2. Repere taxonomice	311
38.1.3. Habitat	311
38.1.4. Factori de patogenitate	311
38.1.5. Receptivitatea la infecția cu chlamidii	313
38.1.6. Infecții determinate de chlamidii	313
38.2. Investigația etiologică în infecțiile cu chlamidii	313
38.2.1. Diagnosticul microbiologic	313
38.2.2. Diagnosticul imunologic	315
38.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul și tratamentul infecțiilor cu chlamidii	315

39. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE MICOPLASME	316
39.1. Date generale	316
39.1.1. O minidefiniție	316
39.1.2. Repere taxonomice	316
39.1.3. Habitat	316
39.1.4. Factori de patogenitate	317
39.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu micoplasme	317
39.1.6. Infecții cu micoplasme	318
39.2. Investigația etiologică a infecțiilor cu micoplasme	319
39.2.1. Diagnosticul microbiologic	319
39.2.2. Diagnosticul serologic	320
39.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul infecțiilor cu micoplasme	321
40. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MICOZELOR	322
40.1. Date generale	322
40.1.1. O minidefiniție	322
40.1.2. Repere taxonomice	322
40.1.3. Habitat	325
40.1.4. Factori de patogenitate	329
40.1.5. Micoze și receptivitatea la micoze	329
40.2. Investigația etiologică a infecțiilor cu levuri	330
40.2.1. Diagnosticul microbiologic	330
40.2.2. Diagnosticul serologic	332
40.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și antibiotice sau chimioterapice pentru terapia infecțiilor determinate de levuri	333
40.3. Investigația etiologică a dermatofiziilor	333
40.3.1. Diagnosticul microbiologic	333
40.3.2. Tratatamentul dermatofiziilor	336
40.4. Investigația etiologică a infecțiilor cu fungi dimorfi	336
40.4.1. Diagnosticul microbiologic	336
40.4.2. Diagnosticul serologic	339
40.4.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și chimioterapice utile contra infecțiilor cu fungi dimorfi	340
40.5. Investigația etiologică a infecțiilor determinate de fungi filamentoși oportuniști	340
41. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CAUZATE DE ACTINOMICETE	341
41.1. Date generale	341
41.1.1. O minidefiniție	341
41.1.2. Repere taxonomice	341
41.1.3. Habitat	341
41.1.4. Factori de patogenitate	341
41.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu actinomicete	342
41.1.6. Infecții cu actinomicete	342
41.2. Investigația etiologică a infecțiilor determinate de actinomicete	342
41.2.1. Diagnosticul microbiologic	343

41.2.2. Diagnosticul imunologic	346
41.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul actinomicozelor	346

Partea a treia

VIROLOGIE

42. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR	348
42.1. Diagnosticul rapid al virozelor	348
42.2. Izolarea și identificarea virusurilor	350
42.3. Metodele serologice în diagnosticul virozelor	355
43. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL GRIPEI	356
43.1. Date generale	356
43.1.1. O minidefiniție	356
43.1.2. Repere taxonomice	356
43.1.3. Habitat	356
43.1.4. Factori de patogenitate	357
43.1.5. Receptivitatea la infecția cu virusurile gripale	357
43.1.6. Gripa	357
43.2. Investigația etiologică a gripei	357
43.2.1. Diagnosticul direct	357
43.2.2. Diagnosticul serologic	358
43.2.3. Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament	358
44. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE UNELE PARAMIXOVIRUSURI	360
44.1. Date generale	360
44.1.1. O minidefiniție	360
44.1.2. Repere taxonomice	360
44.1.3. Habitat	360
44.1.4. Factori de patogenitate	360
44.1.5. Receptivitatea la infecțiile cu paramixovirusuri	361
44.1.6. Infecții determinate de paramixovirusuri	361
44.2. Investigația etiologică a paragripel	361
44.3. Investigația etiologică a rujeolei	362
44.4. Investigația etiologică a oreionului	363
45. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTEROVIROZELOR	364
45.1. Date generale	364
45.1.1. O minidefiniție	364
45.1.2. Repere taxonomice	364
45.1.3. Habitat	364
45.1.4. Factori de patogenitate	364
45.1.5. Receptivitatea la infecții cu enterovirusuri	365
45.1.6. Infecții determinate de enterovirusuri	365
45.2. Investigația etiologică în poliomielită	365
45.3. Investigația etiologică în virozele Coxsackie	366
45.4. Investigația etiologică a virozelor ECHO	366

46. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE	368
46.1. Date generale	368
46.1.1. O minidefiniție	368
46.1.2. Repere taxonomice	368
46.1.3. Habitat	368
46.1.4. Factori de patogenitate	369
46.1.5. Receptivitatea la infecții cu virusurile hepatitei	369
46.1.6. Hepatitele virale	369
46.2. Investigația etiologică a hepatitei A	369
46.3. Investigația etiologică a hepatitei B	370
46.3.1. Diagnosticul direct	370
46.3.2. Diagnosticul serologic	371
46.3.3. Preparate biologice pentru diagnosticul și profilaxia specifică a hepatitei B	371
46.4. Investigația etiologică a hepatitelor non-A, non-B	372
47. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE ROTAVIRUSURI	373
47.1. Date generale	373
47.1.1. O minidefiniție	373
47.1.2. Repere taxonomice	373
47.1.3. Habitat	373
47.1.4. Factori de patogenitate	373
47.1.5. Receptivitatea la infecția cu rotavirus	373
47.1.6. Gastroenterita rotavirală	374
47.2. Investigația etiologică a gastroenteritei virale	374
48. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENCEFALITEI TRANSMISE DE ACARIENI (CĂPUȘE)	375
48.1. Investigația etiologică în encefalita transmisă de acarieni	375
48.1.1. Diagnosticul direct	375
48.1.2. Diagnosticul serologic	376
48.1.3. Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament	376
49. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RUBEOLEI	377
49.1. Date generale	377
49.2. Investigația etiologică a rubeolei	377
50. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RABIEI	379
50.1. Date generale	379
50.1.1. O minidefiniție	379
50.1.2. Repere taxonomice	379
50.1.3. Habitat	379
50.1.4. Factori de patogenitate	379
50.1.5. Receptivitatea la rabie	380
50.1.6. Rabia	380
50.2. Investigația etiologică a rabiei	380
51. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU HERPESVIRUSURI	381

51.1. Date generale	381
51.1.1. O minidefiniție	381
51.1.2. Repere taxonomice și habitat	381
51.1.3. Factori de patogenitate	381
51.1.4. Receptivitatea la infecțiile cu herpesvirusuri	381
51.1.5. Boli cauzate de herpesvirusuri	381
51.2. Investigația etiologică a herpesului simplex	382
51.2.1. Diagnosticul direct	382
51.2.2. Diagnosticul serologic	383
51.2.3. Preparate biologice și medicamente pentru diagnostic, profilaxie și terapie	383
51.3. Investigația etiologică a varicelei	383
51.4. Investigația etiologică a herpesului zoster	383
52. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ADENOVIROZELOR	384
52.1. Date generale	384
52.1.1. O minidefiniție	384
52.1.2. Repere taxonomice și habitat	384
52.1.3. Factori de patogenitate	385
52.1.4. Receptivitatea la adenoviroze	385
52.1.5. Adenovirozele	385
52.2. Investigația etiologică a adenovirozelor	385
52.2.1. Diagnosticul direct	385
52.2.2. Diagnosticul serologic	386
52.2.3. Preparate biologice utilizate în diagnostic, profilaxie și tratament	386
53. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VARIOLEI	387
53.1. Date generale	387
53.2. Investigația etiologică a variolei	387
53.2.1. Diagnosticul direct	387
53.2.2. Diagnosticul serologic	388
53.2.3. Preparate pentru diagnostic, profilaxie și tratament	389
54. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI CU VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV)	390
54.1. Date generale	390
54.1.1. O minidefiniție și reperi structurale	390
54.1.2. Reperi taxonomice	390
54.1.3. Habitat	390
54.1.4. Factori de patogenitate	391
54.1.5. Receptivitatea la infecția cu HIV	391
54.1.6. Infecția cu HIV	391
54.2. Investigația etiologică a infecției cu HIV	391

Partea a patra

MICROBIOLOGIE SANITARĂ

55. MICROBIOLOGIA SANITARĂ: DEFINIȚIE ȘI OBIECTIVE

394

56. INDICATORI MICROBIOLOGICI DE POLUARE A MEDIULUI AMBIANT	395
56.1. Definierea indicatorilor microbiologici de poluare	395
56.2. Caracteristici ale indicatorilor microbiologici	396
56.2.1. Grupul coliformilor	396
56.2.2. Enterococli (streptococli fecali)	397
56.2.3. Clostridii sulfitoreducătoare	397
56.2.4. Stafilococli	398
56.2.5. Streptococli	398
56.2.6. Genul <i>Proteus</i>	399
56.2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	399
56.2.8. Enterofagi	400
56.2.9. Microorganisme termofile	400
57. EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL APEI	402
57.1. Date generale: cadrul problemei și indicații	402
57.2. Efectuarea analizei	403
57.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor de apă	403
57.2.2. Determinarea numărului total de microorganisme (NTM)	404
57.2.3. Determinarea coliformilor	405
57.2.4. Determinarea enterococilor	407
57.2.5. Determinarea stafilococilor	408
57.2.6. Izolarea microflorei patogene	409
57.3. Aprecierea calității apei după indicatorii bacteriologici	411
58. EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL SOLULUI	412
58.1. Date generale	412
58.2. Efectuarea analizei	413
58.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor	413
58.2.2. Pregătirea probei pentru analiză	413
58.2.3. Determinarea numărului total de bacterii	413
58.2.4. Determinarea coliformilor	414
58.2.5. Determinarea <i>C. perfringens</i>	414
58.2.6. Determinarea microorganismelor termofile	415
58.2.7. Determinarea microorganismelor patogene	415
59. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A NĂMOLURILOR CURATIVE	417
60. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A AERULUI	419
60.1. Date generale	419
60.2. Efectuarea analizei	420
60.2.1. Recoltarea probelor	420
60.2.2. Determinarea numărului total de bacterii saprofite	422
60.2.3. Determinarea stafilococilor	422
60.2.4. Determinarea streptococilor	422
60.2.5. Determinarea microorganismelor patogene	423
61. MICROBIOLOGIA PRODUSELOR ALIMENTARE	424
62. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A LAPTELUI ȘI PRODUSELOR LACTATE	426
62.1. Date generale	426

62.2. Efectuarea analizelor	427
62.2.1. Metode de clasificare calitativă a laptelui pentru colectarea din gospodărie	427
62.2.2. Recoltarea probelor și pregătirea lor pentru analiza laptelui și produselor lactate	428
62.2.3. Analiza laptelui, frișcăi, chefirului, laurtului	428
62.2.4. Analiza smântânei, cașcavalului, untului, înghețatei, cheagului	429
62.2.5. Analiza creimei, untului pentru cremă, siropurilor	430
62.2.6. Analiza producției bucătărilor de lapte pentru copii (produse acidolactice pentru alimentarea copiilor)	431
63. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A CĂRNII ȘI PRODUSELOR DIN CARNE	432
63.1. Date generale	432
63.2. Efectuarea analizei	433
63.2.1. Analiza microscopică	433
63.2.2. Examenul microbiologic al cărnii și subproduselor de la orice specie animală sacrificată	433
63.2.3. Analiza sanitaro-bacteriologică a mezelurilor și produselor din carne	435
63.2.4. Analiza produselor culinare și semifabricatelor din carne tocată	435
64. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ SANITARĂ A PEȘTELUI ȘI PRODUSELOR DIN PEȘTE	436
65. PARTICULARITĂȚI DE EXAMINARE MICROBIOLOGICĂ A BĂUTURILOR	437
66. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ SANITARĂ A CONSERVELOR	438
66.1. Date generale	438
66.2. Examinarea conservelor	439
66.2.1. Recoltarea ambalajelor cu conserve	439
66.2.2. Examenul macroscopic al ambalajelor cu conserve	439
66.2.3. Recoltarea din conținutul ambalajelor	440
66.2.4. Depistarea aerobilor mezofili	440
66.2.5. Depistarea anaerobilor mezofili	440
66.2.6. Depistarea aerobilor termofili	440
66.2.7. Depistarea anaerobilor termofili	440
67. MICROBIOLOGIA INTOXICAȚIILOR ALIMENTARE	441
67.1. Toxiinfecțiile alimentare	441
67.1.1. Definiție și etiopatogenie	441
67.1.2. Agenții etiologici ai toxiinfecțiilor alimentare: biologia, izolarea și identificarea lor	442
67.2. Toxicozele bacteriene	444
67.2.1. Toxicoze cauzate de stafilococi	444
67.2.2. Toxicoze cauzate de <i>C. botulinum</i>	444
67.3. Micotoxicozele	445
67.4. Examenul microbiologic complex în cazul otrăvirilor alimentare	446
67.4.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor	446
67.4.2. Criteriile semnificației etiologice	446
67.4.3. Analiza produselor alimentare	446

67.4.4. Analiza materialului de la bolnav	447
68. CONTROLUL BACTERIOLOGIC SANITAR AL INSTITUȚIILOR MEDICALE, DE COPII ȘI ÎNTEPRINDERILOR DE ALIMENTAȚIE PUBLICĂ	448
68.1. Date generale	448
68.2. Efectuarea examinărilor	449
68.2.1. Recoltarea și pregătirea probelor	449
68.2.2. Analiza	450
69. CONTROLUL CALITĂȚII DEZINFECȚIEI ȘI STERILIZĂRII	451
Bibliografie	453

Redactor: *Svetlana Spătaru*
Redactor artistic: *Leonard Cușnireenco*
Tehnoredactor: *Larisa Jucov*
Corectori: *Ala Rusnac, Elena Pistrui*

Bun de tipar 8.12.97. Format 70 × 100¹/₁₆
Coli de tipar conv. 38,06. Coli editoriale 37,5. Comanda 3

Întreprinderea Editorial-Poligrafică Știința
str. Academiei, 3; MD 2028, Chișinău, Republica Moldova
Tel. (3732) 73-96-16; 73-97-50. Fax (3732) 73-96-27

Imprimarea la Firma Editorial-Poligrafică *Tipografia Centrală*,
str. Florilor, 1; MD 2068, Chișinău, Republica Moldova
Departamentul Edituri, Poligrafie și Comerțul cu Cărți