



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA



AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ

GHID

DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC AL INFECȚIILOR TRACTULUI RESPIRATOR



Chișinău, 2021

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA

AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ

GHID
Diagnosticul Microbiologic
al Infecțiilor
Tractului Respirator

Chișinău, 2021

Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale din 21.12.20 proces verbal nr. 4.

Aprobat prin ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr. 26 din 21.01.2021

Colectivul de autori:

Burduniuc Olga, dr. șt. med., conf. univ., master în sănătate publică, ANSP
Bălan Greta, dr. șt. med., conf. univ., master în sănătate publică, USMF „Nicolae Testemițanu”
Spînu Constantin, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar, Om emerit, ANSP
Sofronie Olga, cercetător științific, master în sănătate publică, ANSP
Bivol Maria, cercetător științific stagiar, ANSP

Ghidul este destinat specialiștilor din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, Instituțiilor medico-sanitare care oferă servicii de laborator (medici microbiologi, felceri laboranți) și de asistență medicală primară, specializată și staționar.

Informația prezentată în ghid este relevantă și pentru procesul didactic în formarea și educarea continuă a medicilor și personalului medical cu studii medii.

Ghidul stabilește principii și proceduri în testarea biosubstratelor în scopul diagnosticului microbiologic al infecțiilor tractului respirator și oferă recomandări specifice pentru colectarea, transportarea, investigarea acestor biosubstrate și criteriile de interpretare.

În ghid nu vor fi abordate proceduri de identificare a agenților patogeni. Testarea sensibilității la antimicrobiene a microorganismelor este abordată în standardul EUCAST (AST of bacteria, AST of fungi).

Recenzenți:

Rudic Valeriu, dr. hab., profesor universitar, academician, USMF „Nicolae Testemițanu”
Bucov Victoria, doctor habilitat, profesor universitar, ANSP
Revenu Ninel, doctor habilitat, profesor universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”
Curocichin Ghenadie, doctor habilitat, profesor universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”
Sencu Eusebiu, dr. șt. med., conferențiar universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”

Com. 2838

Î. S. Firma Editorial-Poligrafică „Tipografia Centrală”,

MD-2068, Chișinău, str. Florilor, 1

Tel. 022-49-31-46

Descrierea CIP a camerei Naționale a Cărții din Republica Moldova

Diagnosticul Microbiologic al Infecțiilor Tractului Respirator: Ghid / Burduniuc Olga, Bălan Greta, Spînu Constantin [et al.]; Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova, Agenția Națională pentru Sănătate Publică. – Chișinău: S. n., 2021 (I.S. F.E.-P. „Tipografia Centrală”). – 80 p.: tab.

Referințe bibliogr.: p. 77-79 (44 tit.). – 150 ex.

Ghidul a fost multiplicat cu suportul financiar din cadrul proiectului „Digitalizarea procesului de supraveghere prin implementarea sistemului informațional-epidemiologic COVID-19”

ISBN 978-9975-157-11-7



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun. Chișinău

„21 ianuarie 2021

nr. 26

Cu privire la aprobarea Ghidului
„Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator, în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr.694/2017 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”, conform anexei.

2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale de laborator vor organiza implementarea și monitorizarea eficienței aplicării în activitatea practică a prevederilor Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”.

3. Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea asigurării pieții farmaceutice din Republica Moldova cu medicamentele și dispozitivele medicale incluse în Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”.

4. Compania Națională de Asigurări în Medicină:

1) va asigura finanțarea serviciilor incluse în Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator”;

2) va organiza ghidarea de către angajații din subordine de prevederile Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii contractați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.

5. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va organiza:

1) evaluarea instituționalizării Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale de laborator;

2) evaluarea respectării prevederilor Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în cadrul controalelor efectuate în instituțiile medico-sanitare;

3) asigurarea accesibilității Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” pe pagina web a ANSP și acordarea suportului consultativ-metodic în implementarea acestuia în activitatea prestatorilor de servicii medicale de laborator.

6. Instituțiile de învățământ medical vor organiza implementarea Ghidului „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” în activitatea didactică a catedrelor respective.

7. Ghidul „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor tractului respirator” se plasează pe pagina WEB a Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale.

8. Controlul executării prezentului ordin mi-l asum.

Secretar de Stat

Tatiana ZATÎC



CUPRINS

1. Scopul.....	6
2. Introducere	6
3. Microbiologia tractului respirator și cavităților conecte	8
3.1. Condiția microbiologică a etajului superior al tractului respirator	8
3.2. Condiția microbiologică a etajului mijlociu al tractului respirator.....	12
3.3. Condiția microbiologică a etajului inferior al tractului respirator.....	15
3.4. Condiția microbiologică a cavităților conecte ale tractului respirator.....	22
4. Prelevarea și transportarea probelor	24
4.1. Materialul oral	26
4.2. Secreția nazală	26
4.3. Exsudatul faringian	27
4.4. Exsudatul nazofaringian	28
4.5. Secretul sinuzal	29
4.6. Otoreea	30
4.7. Abcese ale cavității bucale	32
4.8. Secreția epiglotică	32
4.9. Secrețiile tractului respirator inferior	32
5. Cultivarea și identificarea microorganismelor din tractul respirator	37
5.1. Metode non-moleculare de detecție și identificare a virusurilor respiratorii	37
5.2. Metode moleculare de detecție a microorganismelor	38
5.3. Detecția bacteriană	39
5.4. Determinarea cantitativă a microorganismelor din spută, AET și prelevate obținute prin bronhoscopie	45
6. Interpretarea și raportarea rezultatelor	54
6.1. Materialul oral	54
6.2. Secreția nazală	54
6.3. Exsudatul faringian	55
6.4. Secretul nazofaringian	55
6.5. Secretul sinuzal	56
6.6. Otoreea	56
6.7. Secrețiile tractului respirator inferior	57
7. Anexe.....	60
9. Referințe.....	78

ABREVIERI

AET	Lavajul endotraheal
AST	eng. <i>Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
BSL	eng. Biosafety Level
CARDS	Sindromul de suferință respiratorie dobândită în comunitate (eng. <i>Community Acquired Respiratory Distress Syndrome</i>)
CAP	eng. <i>Community Acquired Pneumonia</i>
CE	Celule Epiteliale
CMV	Cytomegalovirus
DFA	Deteție fluorescentă a anticorpilor
ELFA	eng. Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA	eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUCAST	eng. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FC	Fibroză chistică
FDA	Food and Drug Administration
HAP	eng. <i>Hospital Acquired Pneumonia</i>
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMPV	Human Metapneumovirus
IFA	Metoda imunofluorescentă
HSV	Virus Herpes simplex
IRA	Infecțiile respiratorii acute
ITRI	Infecțiile tractului respirator inferior
LFIA	Eng. Lateral flow immunoassay
LBA	Lavaj bronhoalveolar aspirat
MDR	Multidrog Rezistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino-rezistent
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino-sensibil
NAAT	eng. Nucleic Acid Amplification Test
ORL	Otorinolaringolog
PBP	Periajul bronșic protejat
PCR RT	Reacția de polimerizare în lanț în timp real
POC	Point of Care
PMN	Neutrofile polimorfonucleate
RAM	Rezistența la antimicrobiene
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SBH-A	Streptococul beta-hemolitic grup A
TIR	Teste imunologice rapide
TAT	eng. <i>Turnaround time</i>
TRS	Tract Respirator Superior
TRI	Tract Respirator Inferior
VAP	eng. <i>Ventilator Associated Pneumonia</i>
VZV	Varicella-Zoster Virus

1 SCOPUL

Acest ghid descrie etapele: preanalitică, analitică și postanalitică de investigare microbiologică a biosubstraturilor tractului respirator. Sunt relatate principiile generale de testare a microorganismelor (bacterii, fungi, virusuri, paraziți) considerate drept agenți etiologici ai infecțiilor tractului respirator și testele în funcție de agentul etiologic potențial implicat în procesul infecțios. Testele de diagnosticare rapidă trebuie luate în considerare și utilizate în urma validării. O importanță majoră în acest ghid reprezintă și informația care ține de interpretarea rezultatelor investigațiilor microbiologice, utilă în managementul corect al infecțiilor tractului respirator.

2 INTRODUCERE

Infecțiile respiratorii sunt frecvente și contribuie semnificativ la o morbiditate și mortalitate înaltă. Majoritatea pacienților care solicită îngrijiri medicale pentru afecțiuni respiratorii sunt tratați ambulatoriu sau în departamente de urgență, conducând astfel la costuri semnificative de îngrijire medicală. Simptomele infecțiilor tractului respirator provocate de diverși agenți microbieni sunt similare, deseori prezentând deficiențe în stabilirea diagnosticului definitiv. În scopul stabilirii diagnosticului definitiv al ITR se recomandă efectuarea testărilor de laborator în timp util. Studiile au demonstrat că diagnosticul rapid al ITR poate conduce la scăderea duratei de spitalizare, la o mai bună administrare a terapiei antimicrobiene și cohortare a pacienților pentru a preveni infecțiile asociate asistenței medicale. Evidențele medicale demonstrează că majoritatea infecțiilor respiratorii sunt de etiologie virală și e foarte important de a diferenția rapid infecțiile respiratorii virale de cele bacteriene.

Diagnosticul infecțiilor virale și celor bacteriene se poate realiza prin tehnici moderne alternative (ex. PCR rapid multiplex), ce oferă rezultate rapide de identificare (cca 60 min.), și metode clasice, care furnizează atât date de identificare, cât și de testare a sensibilității la preparate antimicrobiene, dar într-o perioadă mai lungă de timp.

Experții internaționali au lansat un set de principii de bază privind utilizarea eficientă a preparatelor antimicrobiene pentru tratarea infecțiilor pediatrice ale TRS (tractul respirator superior), incluzând otita medie acută, sinuzita bacteriană acută și faringita streptococică cu efectuarea antibiogramei pentru evitarea cazurilor de RAM (rezistența la antimicrobiene).

Principiile prevăd:

1. Stabilirea/confirmarea diagnosticului de infecție bacteriană.
2. Evaluarea riscurilor și a beneficiilor tratamentului cu preparate antimicrobiene.
3. Implementarea strategiilor de prescriere judicioasă, inclusiv selectarea celui mai eficient preparat antimicrobian, prescrierea dozei și duratei de tratament adecvate.

RAM reprezintă o amenințare din ce în ce mai mare pentru sănătatea publică mondială. Creșterea consumului de antibiotice e asociată cu dezvoltarea RAM la nivel individual, comunitar, național și internațional.

RAM constituie o povară socială și economică gravă, cauzând anual 25 mii de decese în Uniunea Europeană și 700 mii de decese la nivel mondial, iar în lipsa acțiunilor, potrivit estimărilor, până în 2050, rezistența antimicrobiană ar putea cauza mai multe decese decât cancerul.

În ultimii 30 de ani, nu s-au dezvoltat noi clase de antimicrobiene. Prin urmare, programele de administrare a preparatelor antimicrobiene vizează utilizarea judicioasă și prevenirea utilizării iraționale a acestora.

Infecția acută a căilor respiratorii superioare (precum otita medie, faringita, sinuzita și bronșita acută) e cel mai frecvent motiv pentru prescrierea de antimicrobiene la adulți și copii. Prescrierea preparatelor antimicrobiene în aceste cazuri e adesea inadecvată, frecvent inutilă, soldându-se cu dezvoltarea rezistenței crescute la antimicrobiene, și pune în pericol sănătatea pacienților prin apariția efectelor adverse.

Infecțiile respiratorii acute (IRA) sunt principala cauză de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Deși, de obicei, e mai severă la copii, vârstnici și pacienți imunocompromiși, toate grupele de vârstă sunt receptive. Aceste infecții au impact semnificativ asupra vizitelor la medic și la departamentul de urgență, asupra spitalizării și absenteismului de la locul de muncă și studii.

Cei mai frecvenți agenți responsabili de IRA sunt virusurile respiratorii, urmate de bacterii. Tratamentul empiric cu antibiotice e inițiat frecvent chiar și atunci când infecția virală este foarte probabilă, ceea ce conduce la utilizarea irațională a antibioticelor.

Standardul de aur al diagnosticului ITR de origine bacteriană rămâne a fi metoda bacteriologică, care durează 2-5 zile și medicii sunt impuși să indice terapie empirică. Terapia empirică de primă linie e inadecvată în 40-50% din cazuri și e asociată cu mortalitate înaltă.

Diagnosticul direct al ITR de etiologie virală prin depistarea antigenului, folosind teste de imunofluorescență (IFA), e încă utilizat, fiind limitat, de obicei, la opt virusuri (adenovirusul, virusul influenza A și B, parainfluenza, virusul sincițial respirator (RSV), metapneumovirusul uman), având și o sensibilitate foarte redusă în funcție de titrul viral, vârsta și timpul testării pacientului în raport cu debutul simptomelor. Metodele moleculare cresc depistarea virală datorită unei sensibilități analitice mai mare, comparativ cu metodele convenționale, cum ar fi detectarea antigenului și/sau cultura virală. Totodată, având un randament crescut pentru depistarea virusurilor respiratorii care nu sunt detectate în mod eficient prin metode convenționale, inclusiv rinovirusuri și coronavirusuri.

La copiii cu IRA, ratele de pozitivitate virală variază de la 40 la 45% prin metoda IFA și 67-88% prin metode moleculare. În același timp, la adulți ratele de pozitivitate virală sunt mai mici și pot varia de la 14 la 29% cu IFA, ajungând la 66% prin metode moleculare.

Odată cu dezvoltarea noilor tehnologii, precum sistemele moleculare multiplex, a fost posibilă diminuarea semnificativă a timpului de procesare a probelor. Panelurile destinate testării prelevatelor tractului respirator superior, cât și inferior (de ex. FilmArray, Vivalytic, SmartFinder, Unyvero) pot detecta cca 20 de agenți patogeni în 1-5 ore, astfel permițând diagnosticarea mai rapidă, inițierea unei terapii țintite în timp util, reducerea testărilor suplimentare și a duratei de spitalizare.

3 MICROBIOLOGIA TRACTULUI RESPIRATOR ȘI CAVITĂȚILOR CONECTE (LOCOREGIONALE)

3.1. Condiția microbiologică a etajului superior al tractului respirator

Etajul superior al tractului respirator găzduiește o floră bacteriană abundentă, care reunește peste 1000 de specii din diferite nișe ale macroorganismului: placa dentară, crevasele gingivale, mucoasa linguală, jugală, orofaringe, nazofaringe, criptele amigdaline și cavitatea nazală. Bacteriile anaerobe le domină pe cele aerobe în proporție de 5-10:1. Microorganismele comune sau foarte frecvente și în cantități predominante sunt:

- ✓ bacterii anaerobe: specii din genurile *Bacteroidaceae*, *Veillonella*, *Prevotella*, peptostreptococi, lactobacili etc;
- ✓ bacterii aerobe și facultativ anaerobe: streptococi, neiserii nepretențioase.

Enterobacteriile și pseudomonadele sunt înregistrate rar, dar rata portajului și cantitatea lor crește semnificativ la persoanele imunocompromise.

Terapia cu antibiotice induce disbioze importante ale microbiocenozelor orofaringiene cu predominarea speciei *Staphylococcus aureus*, bacililor coliformi, pseudomonadelor și micetelor levuriforme.

3.1.2. Entități nosologice și condiții patogenetice

Infecțiile tractului respirator superior se manifestă sub formă de:

- ✓ rinite;
- ✓ faringite sau amigdalite;
- ✓ abcese periamigdalene, intraamigdalene sau retrofaringiene

Lipsa barierelor anatomice distincte între segmentele căilor respiratorii superioare permite propagarea infecției prin continuitate, de unde avem și corelarea simptomatologiei clinice și frecvente complicații prin afectarea cavităților conecte și căilor respiratorii inferioare.

Propagarea limfatică a infecției este posibilă mai frecvent în infecțiile de origine bacteriană și mai rar în infecțiile virale.

Virusurile sunt patogenii primari care determină cel mai frecvent infecții ale căilor respiratorii superioare (vezi Tabelul 1, Anexa 1).

Nu există un tratament specific pentru virozele respiratorii și, de regulă, acestea dispar de la sine, dar la lezarea epiteliului respirator și obstrucția congestivă a orificiilor sinuzale sau a trompei lui Eustachio, pot favoriza suprainfecția cu bacterii din microbiota indigenă.

Doar câteva specii de bacterii se manifestă ca agenți microbieni patogeni primari la nivelul căilor respiratorii superioare și determină boli, uneori foarte severe (*Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* serovar b, *Corynebacterium diphtheriae*).

Prognosticul semnelor clinice pentru etiologia bacteriană a acestor infecții este mic. Simptomele infecțiilor tractului respirator fiind similare sunt necesare teste de laborator pentru diferențierea acestora și identificarea agentului etiologic.

Rinite

Rinita reprezintă inflamația mucoasei nazale. Rinita acută este o boală în general virală inițial, dar uneori se poate complica cu o infecție bacteriană.

Virusurile implicate sunt: rinovirusurile, adenovirusurile, coronavirusurile (inclusiv SARS-CoV-2), virusurile gripale, paragripale, virusul sincițial respirator, virusurile Coxackie A (vezi Tabelul 1, Anexa 1).

Faringite

Faringita este o afecțiune a căilor respiratorii superioare și se caracterizează prin apariția unei reacții inflamatorii acute la nivelul mucoasei faringiene.

Inflamația faringelui este frecvent cauza indicării tratamentelor cu antibiotice, având ca rezultat cheltuieli semnificative de asistență medicală și amplificarea fondului plasmidic de rezistență la antibiotice din cauza utilizării nejustificate a acestor preparate.

Faringita acută este una dintre cele mai frecvente stări patologice înregistrate în medicina primară, iar datele relatate de unele studii recente indică cca 12 milioane vizite pe an.

Aproximativ 80% dintre infecțiile ce afectează faringele sunt viroze. Virusurile implicate sunt: rinovirusurile (în special la adulți), adenovirusurile, virusul *Herpes simplex 1*, virusurile Coxackie A și B (mai ales la copii), virusurile gripale (la toate vârstele), paragripale, coronavirusurile (inclusiv SARS-CoV-2), virusul *Epstein-Barr*. Fenomenele inflamatorii fiind mai extinse, pacienții prezintă rinoree, strănut, disfagie, tuse cu febră, în general, moderată, dureri la deglutiție. În infecția cu unele serovaruri adenovirale se asociază conjunctivita. Mononucleoza infecțioasă, determinată de virusul *Epstein-Barr*, se particularizează printr-o angină severă, frecvent ulcerată, adenită cervicală și semne de afectare sistemică.

Un rol important în etiologia faringitelor bacteriene prezintă:

1. *Streptococcus pyogenes*, care este responsabil de majoritatea faringitelor bacteriene, cărora le imprimă gravitate prin complicații infecțioase (otite, sinuzite, mastoidite, adenite cervicale supurate, flegmon amigdalian, celulită difuză a planșeului bucal – angina Ludwig) sau post-streptococice (de ex. reumatismul articular acut și artrita reactivă, glomerulonefrita acută).

Multitudinea serovarurilor de *S. pyogenes* expune populația generală aproape anual riscului acestor faringite, totodată, infecțiile sunt mai frecvente la copii până la 12-14 ani. Faringitele cu tulpini eritrotorigene de *S. pyogenes* se însoțesc cu scarlatină când pacienții nu sunt imuni la această toxină.

2. Alți streptococi piogeni (grup C sau G) sunt ocazional cauza a unor faringite a căror evoluție poate fi gravă. Streptococii grup B și F, de regulă, nu sunt asociați cu faringita.

3. *Chlamydia pneumoniae*. Infecțiile cu *Chlamydia pneumoniae* pot apărea în tractul respirator superior sau inferior. Prezentările clinice variază foarte mult. Perioada de incubație este în general între 3 și 4 săptămâni; cu toate acestea, studiile demonstrează și perioade mai scurte.

Persoanele cu această infecție prezintă cel mai frecvent tuse, febră, cefalee, stare generală de rău și pot dezvolta: laringită, faringită, coriză, pneumonie.

Pacienții pot prezenta o tuse persistentă și stare de rău timp de câteva săptămâni sau luni, în ciuda tratamentului cu antibiotic adecvat.

4. *Mycoplasma pneumoniae* poate provoca boli prin deteriorarea mucoasei sistemului respirator (faringită, pneumonie).
5. *Corynebacterium diphtheriae* determină angine pseudomembranoase grave însoțite de toxinemie.
6. *Arcanobacterium haemolyticum* cauzează ocazional faringite, în special la adolescenți și adulții tineri, asemănătoare celor streptococice. Se sugerează, că în cazurile de eșec al tratamentului și de amigdalită recurentă, se va lua în considerare izolarea lui *A. haemolyticum*.
7. *Neisseria gonorrhoeae*, rar, însă poate cauza faringite. Cu toate acestea, atunci când un medic indică investigarea microbiologică pentru *N. gonorrhoeae*, bazându-se pe dovezi clinice sau pe istoricul pacientului, testarea este justificată.
8. Asociații fuso-spirochetoze determină stomatita și angina Plaut-Vincent-Simanovschi, caracterizate prin leziuni ulcero-necrotice care pot fi acoperite de false membrane.
9. În condiții de disbioză, levurile din microbiota orofaringiană, în special *Candida* spp., se înmulțesc excesiv și pot determina stomatită și faringită, mai frecvent la prematuri, nou-născuți, pacienți imunocompromiși.

Abcese periamigdalienne sau retrofaringiene

Abcesul periamigdalian este o infecție ce debutează în straturile superficiale și care prinde succesiv țesutul subiacent, lichidul purulent fiind localizat mai exact între capsula amigdaliană și peretele faringian. Abcesul periamigdalian este considerat o complicație a amigdalitei acute și se dezvoltă mai frecvent la adulți (la copii și tineri este relativ rar diagnosticat). În contextul evoluției rezistenței la antimicrobiene a microorganismelor incriminate în apariția amigdalitei, specialiștii atestă creșterea incidenței abcesului periamigdalian.

Datorită faptului că abcesul periamigdalian este cel mai frecvent o complicație a faringo-amigdalitei, agenții microbieni implicați în apariția lui sunt, de obicei, aceiași care declanșează procesul infecțios faringian. În general, etiologia este polimicrobiană, implicând atât germeni aerobi, cât și anaerobi. De obicei, abcesul periamigdalian este cauzat de *Streptococcus* spp. ca o complicație a amigdalitei acute. Grupul *Streptococcus anginosus* (anterior cunoscut ca *Streptococcus milleri*) și streptococii grup A au fost stabiliți ca microorganisme-cheie în abcesul peritonsilar. *Fusobacterium necrophorum* și *Fusobacterium nucleatum* sunt, de asemenea, cauze relativ frecvente ale abcesului. Microorganismele anaerobe izolate predominant în abcesele peritonsilare includ *Prevotella*, *Porphyromonas* și *Peptostreptococcus* species. *S. aureus* a fost raportat sporadic ca o cauză a procesului infecțios. Secrețiile purulente pot fi aspirate din abces și trimise pentru testarea bacteriologică.

Abcesul retrofaringian este o colecție purulentă localizată în profunzimea țesutului faringian posterior. Cel mai frecvent aerob implicat este *Streptococcus pyogenes* (streptococul beta hemolitic grup A). Alte microorganisme aerobe găsite în secrețiile purulente ale pacienților cu abces peritonsilar sunt *Staphylococcus aureus* și *Haemophilus influenzae*. *Fusobacterium* reprezentant al microflorei anaerobe, este frecvent citat de sursele științifice ca factor etiologic al abcesului retrofaringian.

3.2. Condiția microbiologică a etajului mijlociu al tractului respirator

Deși supus frecvent contaminării microbiene, prin pulberi și aerosoli inhalați, etajul infraglotic al tractului respirator rămâne necolonizat grație unor eficiente bariere antimicrobiene. Aceste bariere sunt: 1) filtrarea aerodinamică și sedimentarea; 2) transportul muco-ciliar. Eficiența transportului muco-ciliar este remarcabilă: în decurs de o oră sunt eliminate peste 90% dintre bacteriile depuse pe mucoasa bronșică. Doar la cca 20% dintre persoanele sănătoase au fost depistate pe mucoasa traheo-bronșică bacterii nepatogene în număr redus.

3.2.1. Entități nosologice și condiții patogenetice

Infecțiile etajului mijlociu al tractului respirator se manifestă sub formă de:

- ✓ epiglotite;
- ✓ laringite și crup;
- ✓ traheite;
- ✓ bronșite și bronșiolite.

Epiglotite

Epiglotita acută este o formă severă a crupului, determinată la copii între 2 și 4 ani aproape exclusiv de *Haemophilus influenzae* serovar b, la adult sindromul este rar, fiind determinat de streptococi, stafilococi, pneumococi sau *Haemophilus paraphrophilus*.

Alte cauze bacteriene ale epiglotitei includ streptococi beta-hemolitici grup A, speciile *Pseudomonas* și *Mycobacterium tuberculosis*. Speciile *Candida* și speciile *Aspergillus* sunt observate la pacienții imunocompromiși.

Notă: Prelevarea probelor de cercetare de la nivelul epiglotitei inflamate este interzisă, deoarece poate determina spasm glotic cu asfixie, iar izolarea *Haemophilus influenzae* de la acest nivel nu este un criteriu suficient de semnificație clinică.

Se pot practica hemoculturi, care sunt pozitive cu *Haemophilus influenzae* la cca 50% dintre copiii investigați.

Laringite și crup

Laringita este inflamația laringelui. În cele mai multe cazuri, laringita este cauzată de o infecție virală sau de bacterii precum *Corynebacterium diphtheriae*, deși aceasta este rară. Laringitele acute complică frecvent răceala comună, sindrom cauzat de variate virusuri respiratorii (90%). *Moraxella catarrhalis* este izolată mai frecvent din nazofaringele adulților cu laringită acută, de unde și concluzia că poate fi implicată în etiologia sindromului. Infecția se poate extinde și în etajul subglotic. La copii sub vârsta de 3 ani complicația este mai severă și frecvent evoluează cu sindromul de crup dominant prin semne de obstrucție respiratorie acută. Bacilul difteric este actualmente o cauză excepțională a crupului. *Mycobacterium tuberculosis* poate infecta laringele pe cale bronhogenă sau hematogenă și determină laringite cronice.

Uzual, examenul bacteriologic al exsudatului faringian urmărește numai excluderea difteriei ca o cauză a crupului la copii. La pacienții cu laringite cronice, medicul otorinolaringolog poate solicita depistarea micobacteriilor în probe laringiene.

Recent sunt înregistrate cazuri care sugerează implicarea MRSA în laringita acută și, de regulă, aceasta dispare fără tratament într-o săptămână. Printre simptomele laringitei se numără răgușeala, pierderea vocii și durerile de gât.

Alte cauze mai puțin frecvente ale laringitei cronice sunt infecțiile bacteriene (streptococii grup A, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* și *Mycobacterium tuberculosis*) sau infecțiile fungice (specia *Candida*, specia *Blastomyces*) și infecțiile parazitare.

Totodată, laringita poate avea ocazional alte cauze, cum ar fi fumatul, consumul de alcool, suprasolicitarea vocii, refluxul de acid din stomac (denumit și boala de reflux gastroesofagian), infecții rare, alergii sau inhalare de iritanți/substanțe chimice. Aceasta este cunoscută sub numele de laringită cronică și simptomele durează mult mai mult.

Traheite

Traheita este inflamația acută sau cronică a mucoasei care tapetează interiorul traheii. Forma cea mai frecvent întâlnită este traheita acută virală, care se răspândește în perioada epidemiilor de primăvară și toamnă, care se vindecă spontan în câteva zile. Traheita este de cele mai multe ori asociată cu o rinofaringită, laringită sau bronșită. Dintre virusuri, cel mai frecvent se întâlnesc: virusul paragripal, virusul gripal, adenovirusurile, ocazional virusul respirator sincițial, metapneumovirusul, rinovirusuri, coronavirusuri, echovirusuri.

Haemophilus influenzae și *Staphylococcus aureus* sunt cei mai frecvenți agenți care determină suprainfecțiile bacteriene ale traheii.

Bronșite și bronșiolite

Bronșita este o afecțiune respiratorie caracterizată prin inflamarea pasajelor bronșice, căile respiratorii care conectează traheea la plămâni.

Bronșita, de cele mai multe ori, este produsă de infecții virale și poate fi agravată de anumite suprainfecții bacteriene.

Bronșiolita este o boală acută infecțioasă, predominant virală, caracteristică sugarului și copilului mic, și care este consecința unei obstrucții inflamatorii la nivelul căilor aeriene mici. Virusul respirator sincițial este agentul etiologic major în peste 60% din cazurile de bronșiolită acută.

Au fost identificați și alți agenți patogeni care cauzează bronșită și bronșiolită: virusuri (adenovirusuri, virusuri gripale și paragripale, virusul rujeolei), *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* (în special în rândul copiilor mai mari și adulților), *Chlamydia pneumoniae*.



3.3. Condiția microbiologică a etajului inferior al tractului respirator

Infecțiile tractului respirator inferior (ITRI) sunt cauzate de variate microorganisme și, prin gravitatea lor, multe impun tratament antibacterian. Desigur, circumstanțele clinice (simptomatologie, boli de fond, vârstă), paraclinice (examenul radiologic, leucograma, procalcitonina, viteza de sedimentare a hematiilor etc.) și epidemiologice (infecții comunitare sau asociate asistenței medicale, sporadice sau epidemice) pot orienta diagnosticul către un grup mai larg sau mai restrâns de agenți etiologici. Terapia antimicrobiană orientată numai pe criteriile clinice și epidemiologice nu poate acoperi întregul spectru etiologic al acestor infecții, iar bacteriile implicate mai frecvent în etiologia ITRI au dobândit, în proporții variate, rezistență la antibioticele de elecție. De aici apare și relevanța privind indicarea și testarea microbiologică a prelevatelor din TRI, care este o investigație frecvent dificilă și complexă.

3.3.1. Entități nosologice și patogenetice ale ITRI

Infecțiile etajului inferior al tractului respirator reunesc variate entități clinice și etio-patogenetice – pneumonii acute și cronice, abces pulmonar, empiem și fibroză chistică (boală ereditară în care secreția vâscoasă în căile respiratorii determină o inflamație permanentă). Unele sunt infecții primare, altele sunt secundare unor deficiențe locale sau generale ale apărării antiinfecțioase. La eliminarea dificilă a microorganismelor din tractul respirator ce aparțin microbiotei orofaringiene sau din mediul extern, acestea persistă pe mucoasa traheo-bronșică și pot iniția colonizări abortive sau de durată, variate ca spectru și amploare în raport cu importanța condiției care le-a generat. Microorganismele dotate cu suficiente capacități patogene, pentru a rupe noul echilibru stabilit cu gazda, inițiază infecții secundare ale TRI.

ITRI, primare sau secundare, sunt cel mai frecvent transmise aerogen, mai rar sunt localizări în cadrul unor infecții bacteriene (bruceloză, sepsis etc.).

Germeii asociați pneumoniei variază în funcție de tipul pneumoniei:

Pneumonia comunitară (Community Acquired Pneumonia - CAP) apare la un pacient care nu este internat sau care nu este într-o unitate de îngrijire pe termen lung mai mult de 14 zile înainte de debut.

Agenții cauzali frecvent implicați în pneumonia comunitară (PC) sunt:

- *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*;
- *Staphylococcus aureus* (după gripă sau diseminare hematogenă);

- *Klebsiella pneumoniae* (pneumonie necrozantă severă la alcoolici și boschetari).

Agenții cauzali mai puțin comuni:

- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter cloacae*
- Virusuri respiratorii

Agenții cauzali atipici ai PC:

- *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*
- Tularemia (*Francisella tularensis*)
- Fungi endemici
 - *Histoplasma capsulatum*
 - *Cryptococcus neoformans neoformans* și *neoformans gattii*
 - *Coccidioides immitis*
- *Mycobacterium tuberculosis* și micobacterii netuberculoase

Pneumonia achiziționată în spital (Hospital Acquired Pneumonia - HAP) apare la mai mult de 48-72 de ore de la internare, în afara perioadei de incubatie, la momentul internării și neasociată cu ventilația. HAP este o infecție nosocomială comună, deseori de origine bacteriană și este cea mai frecventă în unitățile de terapie intensivă medicală și chirurgicală. HAP contribuie semnificativ la creșterea costului îngrijirii spitalicești și la durata spitalizării, prezentând o morbiditate și mortalitate de la 25 la 50%.

Agenții cauzali frecvent implicați:

- *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA)
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae* grup*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Enterobacter cloacae*
- *Pseudomonas* spp.



Agenții cauzali mai puțin comuni:

- *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex**
- *Serratia marcescens*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Haemophilus influenzae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

* *Klebsiella pneumoniae* grup – *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*.

** *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex – *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*.

Agenții cauzali atipici ai HAP:

- Virusuri respiratorii (*Influenza*, *RSV*, *Parainfluenza*, *Human metapneumovirus*)
- *Legionella pneumophila*
- *Legionella micdadei*
- Fungi (Aspergiloze, Mucormicoze)

Pneumonia Asociată Ventilării (Ventilator Associated Pneumonia - VAP) se dezvoltă la 48-72 de ore sau mai mult după ce ventilarea mecanică a fost realizată cu ajutorul unui tub endotraheal ori traheostomie. Majoritatea sunt bacteriene, cauzate de microorganisme Gram negative, *Staphylococcus* spp., microorganisme MDR.

Debut precoce:

- Microorganisme comunitare dobândite (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*).

Debut tardiv (MDR):

- MRSA
- *Pseudomonas* spp.
- *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae* grup
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Serratia marcescens*

Cauze atipice:

- Virale (CMV, HSV, VZV)
- *Legionella pneumophila*
- *Legionella micdadei*
- Fungi (*Aspergillus*, *Mucor*, *Pneumocistis*)

Fibroza chistică (mucoviscidoza)

Fibroza chistică (FC) este cauzată de un defect al genei reglatoare a conductanței transmembranei care afectează transportul ionilor și al apei în epitelii. Aceasta conduce la o boală pulmonară progresivă asociată cu infecții pulmonare, care sunt principala cauză de morbiditate și mortalitate la pacienții cu FC. Agenții patogeni majori sunt *S. aureus*, *H. influenzae* (de obicei, neîncapsulat la pacienții cu FC), *S. pneumoniae* și pseudomonade, în special tulpinile mucoide de *P. aeruginosa*. Tulpinile de *P. aeruginosa* cu sensibilitate diferită la antibiotice pot fi izolate dintr-o singură probă. De asemenea, pot fi prezenți anaerobii în asociație cu speciile *Aspergillus* și micobacterii, altele decât *Mycobacterium tuberculosis*.

Analiza nucleotidelor secvenței genice *recA* sugerează că complexul *Burkholderia cepacia* este format din mai multe genomuri strâns legate. Poate să apară transmiterea complexului de *B. cepacia* între pacienți, iar unii pacienți cedează la „sindromul *B. cepacia*”, care este o pneumonie fulminantă rapidă, uneori însoțită de septicemie.

Micobacteriile non-tuberculoase reprezintă o problemă din ce în ce mai mare pentru acest grup de pacienți, în special *M. abscessus*. Testarea este relevantă la pacienții care prezintă o deteriorare a funcției pulmonare și nu a fost identificat un agent patogen semnificativ clinic.

Microorganisme precum *Ralstonia*, *Achromobacter* și *Pandoraea* sunt agenți patogeni emergenți în bolile pulmonare structurale cronice, la fel, au fost implicate și virusuri.

O problemă semnificativă și de importanță globală este și rezistența la antibiotice, în special la *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* și *P. aeruginosa*, ce limitează opțiunile de tratament al acestor pacienți.

Pneumonia de aspirație

Procesul pulmonar infecțios, care se dezvoltă după pătrunderea anormală a fluidelor în tractul respirator inferior, se numește pneumonie de aspirație. Fluidul aspirat poate prezenta secreții orofaringiene, anumite particule sau poate fi, de asemenea, conținut gastric. Mai multe studii au demonstrat că pneumonia prin aspirație constituie 5-15% din



numărul total de pneumonii dobândite în comunitate. Rata mortalității în pneumonie prin aspirație depinde în mare măsură de volumul și conținutul aspiratului și poate varia până la 70%. Prin testarea de rutină pot fi detectate doar unele specii microbiene (poate fi cultură mixtă de germeni aerobi și anaerobi orali).

Abcesul pulmonar

Abcesul pulmonar se poate dezvolta secundar pneumoniei de aspirație, caz în care cel mai frecvent afectată este zona medie dreaptă. Unele microorganisme (de ex. *S. aureus* și *K. pneumoniae*) pot da naștere la formarea de abcese multifocale, iar prezența mai multor abcese mici este uneori denumită pneumonie necrozantă.

Nocardioza, care apare aproape întotdeauna la persoanele imunocompromise, se poate prezenta ca abcese pulmonare.

Abcesele ca urmare a răspândirii infecției transmise prin sânge dintr-un focar îndepărtat, pot apărea în condiții precum endocardita infecțioasă.

Burkholderia pseudomallei poate provoca abcese pulmonare sau pneumonie necrozantă la cei care au vizitat zone endemice (sud-estul Asiei și nordul Australiei), la persoanele imunocompromise, în special la cei cu diabet zaharat.

Sindromul Lemierre sau necrobaciloza apare ca o infecție acută orofaringiană și se referă la tromboflebite infecțioase ale venei jugulare interne, frecvent evoluează dezvoltat ca o complicație a unei infecții bacteriene la nivelul gâtului. Tromboflebita este o afecțiune gravă și poate conduce la complicații sistemice suplimentare, cum ar fi embolizarea septică și infecția metastatică. Plămânul fiind cel mai frecvent implicat, și se pot dezvolta abcese multifocale, *Fusobacterium necrophorum* este agentul patogen adesea izolat din hemoculturi la pacienții cu acest sindrom.

Pneumonia provocată de Legionella

Pneumonia este cea mai frecventă manifestare a infecțiilor cu *Legionella*. Severitatea variază de la o formă clinică a pacientului de gravitate ușoară până la una severă, care poate pune în pericol viața. Debutul este de obicei brusc cu pirexie, mialgie, cefalee și tuse neproductivă, de obicei, după o perioadă de incubare de 2-10 zile. S-a constatat că timpul de incubație este de până la 20 de zile, în unele cazuri care implică băi cu hidromasaj și SPA. Diareea apoasă poate fi prezentă și pot apărea simptome neurologice de la dureri de cap ușoare până la encefalopatie. Radiografia toracică prezintă infiltrate pulmonare, pro-

gresând până la consolidare, deseori cu efuziune pleurală. Febra Pontiac (non-pneumonică) este o boală febrilă acută care apare la 24-48 de ore de la expunerea la orice specie, dar în special la *Legionella pneumophila*, *Legionella feeleii*, *Legionella micdadei* și *Legionella anisa*. Simptomele clinice sunt asemănătoare gripei și este, de obicei, autolimitată, fără implicare pneumonică. S-a constatat că la copii este o perioadă de incubație mai scurtă decât la adulți și prezintă simptome precum dureri articulare și erupții cutanate, în timp ce simptomele obișnuite la adulți includ febră, vertij, dureri de cap și abdominale, oboseală, artralгии.

Pneumonia provocată de *Mycoplasma pneumoniae*

Infecțiile cu *Mycoplasma pneumoniae* au un spectru larg de simptome și manifestări clinice. Pneumonia cauzată de *M. pneumoniae* este un tip de pneumonie bacteriană atipică, deoarece nu răspunde la sulfonamide sau penicilină (beta-lactame). Manifestările clinice variate și metodele de diagnostic disponibile limitate prezintă provocări pentru identificarea corectă a cazurilor de infecție cu *M. pneumoniae* și tratarea adecvată a pacienților. Experții estimează că infecțiile cu *M. pneumoniae* reprezintă între 1 și 10 din fiecare 50 de cazuri de pneumonie dobândită în comunitate.

M. pneumoniae se răspândește prin picături aeriene de la o persoană la alta și este exclusiv un agent patogen uman.

M. pneumoniae produce un factor unic de virulență cunoscut sub denumirea de toxină CARDS (eng. Community Acquired Respiratory Distress Syndrome). Unii autori presupun implicarea toxinei CARDS în patogenizarea infecției, ceea ce cauzează inflamații și disfuncții ale căilor respiratorii. *M. pneumoniae* habitează în principal pe suprafața celulelor epiteliale respiratorii, poate invada țesuturile și se reproduce intracelular.

Infecțiile fungice ale TRI

Speciile *Candida* sunt cauze extrem de rare ale infecțiilor TRI. Ocazional, infecția apare ca urmare a diseminării hematogene. Diagnosticul este dificil, având în vedere că căile respiratorii pot deveni colonizate la pacienții imunocompromiși tratați cu antibiotice.

Aspergiloza este o infecție cauzată de *Aspergillus*, fung comun al mediului înconjurător, întâlnit, atât în încăperi, cât și în exterior. Majoritatea persoanelor inspiră sporii de *Aspergillus* în fiecare zi, fără a se îmbolnăvi. Cu toate acestea, persoanele cu sistem imunitar slăbit sau boli pulmonare prezintă un risc mai mare de a dezvolta probleme de sănătate din cauza *Aspergillus*, precum reacții alergice, infecții pulmonare și infecții cu implicarea altor organe.



Aspergiloza invazivă rămâne în continuare o infecție cu potențial patogen la pacienții imunocompromiși. Astfel, la pacienții diagnosticați cu leucemii, tumori maligne, tuberculoză, mucoviscidoză, SIDA sau aflați sub tratament imunosupresor, se întâlnesc mai frecvent forme severe de infecție.

Complexul de specii *Aspergillus fumigatus* este unul dintre cele mai răspândite specii, care provoacă infecții fungice. Un număr semnificativ de cazuri nu sunt diagnosticate, din cauza sensibilității reduse a testelor disponibile. Screening-ul pacienților, predispuși la infecții fungice, la antigenul galactomannan în ser și LBA în combinație cu metodele de detecție moleculară (de exemplu, 18 ARNr, regiunea ITS) crește rata de diagnosticare. Cu toate acestea, detectarea ADN-ului fungic nu poate diferenția colonizarea de infecția activă (vezi Anexa 6).

Pneumonia pneumocistică este cauzată de *Pneumocystis jirovecii*. Este cea mai frecventă cauză de pneumonie severă la pacienții cu infecție avansată HIV/SIDA. Pneumonia cu pneumocist apare și la numeroși alți adulți și copii imunocompromiși. Se prezintă subacut cu tuse, febră și hipoxie ca trăsături de bază și este deseori inaparentă inițial. Cele mai relevante prelevate pentru diagnostic sunt biopsia LBA și transbronhială, dar obținerea acesteia din urmă prezintă un anumit risc pentru pacient. Specimenele LBA și de spută indusă sunt utile pentru metodele de detecție moleculară.

Unii agenți cauzali fungici rari ai TRI sunt endemici pentru zone geografice definite. Deși multe forme sunt subclinice, infecțiile clinic aparente pot fi ocazional importate. Aceste boli apar la persoanele imunocompetente și sunt raportate cu manifestări mai severe la pacienții imunocompromiși. Diagnosticul trebuie luat în considerare la călătorii întorși din zonele endemice care prezintă boli respiratorii sau pneumonie, în special dacă aceștia nu răspund la terapia standard. Aceste infecții includ: histoplasmoză, cauzată de *Histoplasma capsulatum* (sud-estul SUA, America Centrală, Africa, Australia și Asia de Est); coccidioidomicoză, cauzată de *Coccidioide immitis* și *C. posadasii* (sud-vestul SUA, America Centrală și de Sud) și blastomicoză cauzată de *Blastomyces dermatitidis* (estul SUA, America Centrală și de Sud și Africa). Aceste infecții prezintă caracteristici distinctive, cu toate acestea este adesea dificil să le diferențiezi clinic de alte infecții respiratorii, în special în fazele lor incipiente. Paracoccidioidomicoza cauzată de *Paracoccidioides brasiliensis* (America Centrală și de Sud) provoacă, de obicei, o infecție pulmonară primară asimptomatică. *Talaromyces* (anterior *Penicillium*) *marneffeii* (sud-estul Asiei, sudul Chinei) ar trebui, de asemenea, să fie luat în considerare atunci când persoana a călătorit în aceste regiuni. Infecțiile fungice se pot reactiva pe fundal de statut imunitar compromis.

Criptococcoza este o cauză neobișnuită a pneumoniei, de obicei, la gazda imunocompromisă, poate fi asociată cu meningita și este o boală care definește SIDA. Pneumonia poate fi cauzată de *Cryptococcus neoformans*, acest patogen având distribuție la nivel mondial. Detectarea antigenului criptococic circulant în ser sau LBA este semnificativ în diagnosticul pneumoniei criptococice.

Infecții parazitare

Mai multe infecții cu helminți pot da naștere sindromului Löffler (infiltrat eozinofilic pulmonar tranzitoriu), caracterizat prin infiltrate pulmonare neuniforme și eozinofilie însoțite de simptome de tuse, febră și scădere ponderală. Aceste semne și simptome sunt asociate cu trecerea formelor larvare prin plămâni și includ *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma* spp. și *Strongyloides stercoralis*.

Paragonimus westermanii are o distribuție largă și este deosebit de răspândit în Orientul Extrem, în subcontinentul indian și în Africa de Vest. Infecția umană se dobândește prin consumul de crabi sau raci de apă dulce netratați termic. Deși infecția poate fi asimptomatică, infestările grave se manifestă prin infiltrate pulmonare, care pot evolua spre tuse cronică productivă cu dureri toracice pleuritice. Infecția este, de obicei, diagnosticată prin identificarea ouălor de *P. westermanii* în spută. Ouăle se găsesc uneori în probe de scaun (ele fiind înghițite în timpul tusei). De asemenea, se poate efectua o biopsie tisulară pentru a căuta ouăle într-o probă de țesut. Teste specifice și sensibile pentru determinarea anticorpilor pe baza antigenilor *P. westermani* sunt disponibile comercial.

3.4. Condiția microbiologică a cavităților conecte ale tractului respirator

Sinusurile paranazale și urechea medie rămân necolonizate datorită eliminării eficiente a microflorei ocazionale, prin transportul muco-ciliar.

3.4.1. Entități nosologice și patogenetice ale cavităților conecte ale tractului respirator

Rinosinuzite

Rinosinuzita este inflamarea mucoasei cavității nazale și a pituitarei sinusurilor paranazale prin apariția unei secreții purulente în interiorul sinusurilor.

Toate condițiile care determină transportul muco-ciliar al epiteliului respirator și/sau obturează orificiile ostiomeatale (reacții alergice, viro-

ze respiratorii, vegetații adenoide, deviații ale septului nazal etc.) favorizează colonizarea bacteriană a acestor cavități și dezvoltarea procesului infecțios. Infecțiile dentare mixte, dominate de bacterii anaerobe, pot afecta, prin contiguitate, sinusurile maxilare.

Etiologia rinosinuzitelor bacteriene acute este dominată de *Streptococcus pneumoniae* și *Haemophilus influenzae* (mai frecvent serovaruri non-b), streptococi grup A, *Staphylococcus aureus* și *Moraxella catarrhalis*. Peptostreptococii, alte bacterii anaerobe nesporulate sau neiserii sunt microorganisme rar implicate, iar bacilii Gram negativi aerobi sau facultativ anaerobi și mai rar. Ocazional poate fi implicată și *Mycoplasma pneumoniae*.

În rinosinuzitele bacteriene cronice infecția este, de obicei, mixtă, cu implicarea bacteriilor anaerobe nesporulate.

Otite

Etiologia și patogenia otitelor acute medii și a otitelor externe sunt complet diferite.

Otita medie

Otita medie acută reprezintă o afecțiune inflamatorie a urechii medii, cu etiologie predominant virală (45-70%). Factorii bacterieni incriminați sunt: *Streptococcus pneumoniae* (25-50%), *Haemophilus influenzae* (15-40%), *Moraxella catarrhalis* (3-20%), *Streptococcus pyogenes* (2%), *Staphylococcus aureus* (1%). Conform studiilor și datelor prezentate în literatura de specialitate, 50% din otitele medii acute sunt autolimitante.

Otita externă

Patogenetic au particularități proprii infecțiilor tegumentului. Dovezile clinice demonstrează necesitatea diferențierii între tamponul cu exsudatul leziunii tegumentare a conductului auditiv extern și tamponul cu exsudat prelevat din fistula timpanului.

Mai frecvent otita externă este cauzată de specii din genul *Pseudomonas*, în special *Pseudomonas aeruginosa* și alte bacterii aerobe în condiții favorizante. Ocazional poate fi ca agent etiologic și *Staphylococcus aureus*, iar bacteriile anaerobe nu sunt implicate în aceste infecții superficiale.

Otita externă cronică se datorează colonizării cu Enterobacteriaceae, fungi și se recomandă de a o trata prin toaleta conductului auditiv extern, fără indicarea tratamentului antibacterian/antifungic.

4 PRELEVAREA ȘI TRANSPORTAREA PROBELOR

Probele colectate din tractul respirator superior (material faringian, nazal, nazo-faringian, auricular sau oral) sunt adesea contaminate cu flora indigenă.

Agenții microbieni depistați în faringe sau în cavitatea nazală ca factori etiologici ai ITRS pot fi prezenți și la persoane sănătoase, având statut de purtători de agenți patogeni.

Din aceste motive, probele non-invazive, în majoritatea cazurilor, nu oferă suficientă informație privind rolul bacteriilor, cum ar fi: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* și *Moraxella catarrhalis* în infecțiile tractului respirator inferior, otită medie sau sinuzită, și nu necesită să fie investigate de rutină.

În scopul diagnosticului microbiologic al otitei medii și rinosinuzitei, ghidurile internaționale recomandă colectarea probelor prin metode invazive (conținutul din sinusuri, exsudat obținut prin timpanocenteză).

Colectarea probelor prin metode non-invazive se practică la copii:

- identificarea agenților patogeni specifici – streptococul beta-hemolitic grup A (SBH-A), *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae* și virusurile respiratorii, la pacienții simptomatici cu probabilitate mare de infectare;
- detectarea stării de purtător pentru unii agenți patogeni (de ex. stafilococi la pacienții chirurgicali).

Informația utilă în scopul stabilirii unui diagnostic corect, prelevatele relevante și agenții etiologici implicați în infecțiile TRS sunt redată în Tabelul 1.

Tabelul 1. Probe relevante pentru diagnosticul infecțiilor bacteriene și fungice ale tractului respirator superior

Probe	Agentul patogen	Maladia sau infecția
Material oral	<i>Candida albicans</i>	Candidoză orală
	SBH-A, <i>Staphylococcus aureus</i>	Ulcerații în cavitatea orală, parotidită
Material nazal	<i>Staphylococcus aureus</i> * <i>S. aureus</i> (MRSA)*	Portaj
	SBH-A	Portaj
	<i>Klebsiella ozaenae</i> *	Ozenă
	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> *	Rinoscleromă

Probe	Agentul patogen	Maladia sau infecția
Material faringian	SBH-A	Faringită, amigdalită streptococică
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> * <i>Corynebacterium ulcerans</i> *	Difterie, faringită membranoasă, amigdalite
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	Faringită gonococică
	<i>Neisseria meningitidis</i> *	Portaj
	<i>Borrelia vincentii</i> (spirochete)* + anaerobi (bacili fusiformi)*	Angina Vincent
Material nazofaringian	<i>Bordetella pertussis</i> * <i>Bordetella parapertussis</i> *	Tuse convulsivă
	SBH-A	Faringită streptococică
	<i>Neisseria meningitidis</i> *	Portaj
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	Difterie
Material din conductul auditiv extern	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Otită externă
	<i>S. aureus</i>	
	SBH-A	
	Agenti mai rar întâlniți: <i>Vibrio alginolyticus</i>	
	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Pseudomonas spp.</i> , enterobacterii	Otită externă cronică
Lichid recoltat prin timpanocenteză sau recoltat după timpanotomie	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> Agenti patogeni rar întâlniți: <i>S. aureus</i> SBH-A, enterobacterii, <i>Alloicoccus otitidis</i> Cultură pură de orice microorganism	Otită medie acută
	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. aureus</i> /MRSA, anaerobi, cultură pură de orice microorganism**	Otită medie cronică
Punctat sinuzal	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. anginosus</i> , SBH-A, <i>Pseudomonas spp.</i> , enterobacterii, fungi, anaerobi (<i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>), cultură pură de orice microorganism**	Sinuzită
Material prelevat din ochi (conjunctive)	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> *, <i>Moraxella spp.</i> , SBH-A, <i>Chlamydia trachomatis</i> ***	Conjunctivită
Hemocultură	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Sindromul Lemierre

* Indicare pentru examinare de către medicul clinician;

** Importanța clinică trebuie anunțată medicului clinician;

*** Diagnostic molecular/detectarea antigenului/izolarea pe culturi celulare.

4.1. Materialul oral

Indicații

- ✓ materialele orale se recoltează în special în vederea evidențierii unei micoze orale;
- ✓ mai rar, pentru diagnosticul anginei Vincent;
- ✓ parotidita.

Mod de recoltare și transportare

- leziunile din cavitatea bucală (faringe, în cazul anginei) se șterg cu tamponul steril;
- tamponul se introduce în mediul de transport Stuart sau Amies;
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere de maxim 24 de ore.

4.2. Secreția nazală

Indicații

Pielea și mucoasa nazală este colonizată de diverse microorganisme (bacterii, micete și virusuri). Colonizarea nazală cu *S. aureus* crește riscul infecției stafilococice, în special infecții postoperatorii ale plăgilor sau infecții asociate cateterizării. Prin urmare, această colonizare deseori este asociată cu infecții cutanate, precum și infecții asociate asistenței medicale.

Astfel, prelevarea materialului nazal este relevantă în:

- ✓ screening-ul pentru depistarea portajului de *Staphylococcus aureus* meticilin sensibil (MSSA) înainte de intervenții pe cord și piodermită persistentă;
- ✓ depistarea portajului de MRSA (controlul focarelor de MRSA în departamentele clinice de risc);
- ✓ depistarea portajului de SBH grup A;
- ✓ în unele infecții cauzate de *Klebsiella rhinoscleromatis*/*Klebsiella ozaenae*.

Notă: Investigarea probelor se efectuează numai în cazul indicării scopului testării. În lipsa acestei informații este necesar de a contacta medicul ORL pentru a concretiza scopul investigației. În caz contrar, proba se va rebuta.

Mod de recoltare și transportare

- pacientul se așază pe scaun cu fața spre o sursă de lumină, gâtul în ușoară extensie;
- cu același tampon umectat cu ser fiziologic steril se șterg pe rând ambele orificii nazale anterioare;
- tamponul se rotește de cel puțin 5 ori în fiecare nară, apăsând egal și ferm peretele vestibulului nazal;
- tamponul se introduce în mediul de transport Amies sau Amies cu cărbune;
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere până la 24 de ore.

Notă: Uneori medicul poate solicita examenul bacteriologic al exsudatului nazal dintr-o anumită cavitate nazală (stângă sau dreaptă). În acest caz prelevarea se efectuează cu tampoane diferite, din cavitatea nazală dreaptă sau stângă, după cum e specificat în fișa de trimitere.

4.3. Exsudatul faringian

Indicații

- ✓ diagnosticul faringitelor și anginelor cauzate de *Streptococcus pyogenes* (*Streptococ grup A*) și de streptococii grup C, grup G, *Arcanobacterium hemolyticum*;
- ✓ în context clinic sugestiv, la cererea clinicianului, notat în fișa de trimitere, se efectuează diagnosticul altor faringite bacteriene (faringita gonococică), a candidozei; angina Plaut-Vincent-Simanovschi (asociații fuso-spirochetoze);
- ✓ la pacienții cu transplant și cei hematologici, prelevatele vor fi testate pentru izolarea *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* sau *Candida albicans*.

În cazul abceselor periamigdalene, se recomandă ca materialul prelevat să fie obținut prin aspirare.

Mod de recoltare și transportare

- se prelevează dimineața înainte de toaleta cavității bucale și a ingerării alimentelor, lichidelor, fumat;

- în cazuri excepționale este acceptată recoltarea exsudatului faringian, în timpul zilei, la minimum 3 ore după ultima ingereare de alimente, lichide, fumat;
- pacientul se așază pe scaun cu fața spre o sursă de lumină, gâtul în ușoară extensie, se deprimă baza limbii cu o spatulă sterilă;
- în timp ce pacientul pronunță vocala A, se aplică cu precizie tamponul steril pe amigdale sau peretele posterior al faringelui, orice zonă inflamată, ulcerată sau cu depozit purulent, falsă membrană, se pătrunde în criptele amigdalieni;
- se evită atingerea tamponului de baza limbii sau de palatul moale;
- când există membrane false, acestea se detașează de la periferie, iar pe mucoasa subdiacentă se aplică tamponul steril;
- tamponul se introduce în mediu de transport Amies sau Amies cu cărbune (obligator, de ex. în faringită cauzată de *N. gonorrhoeae*, sursă/contact cu *N. meningitidis*);
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere de maxim 24 de ore.

4.4. Exsudatul nazofaringian

Indicații

- ✓ depistarea unor bacterii mai frecvente la acest nivel (portajul de *Neisseria meningitidis*, diagnosticul tusei convulsive, diagnosticul difteriei);
- ✓ detectarea prezenței în nazofaringe a speciei *Moraxella catarrhalis* asociată cu laringită;
- ✓ diagnosticul faringitei streptococice la copii mici.

Probele recoltate din nazofaringe nu trebuie investigate de rutină în cazul suspjecției de otită medie, sinuzită sau infecții ale tractului respirator inferior.

Notă: Investigarea probelor se efectuează numai în cazul indicării agentului patogen solicitat.

În lipsa acestei informații este necesar de a contacta medicul clinician pentru a concretiza scopul investigației. În caz contrar, proba se va rebuta.

Mod de recoltare și transportare

- pacientul se așază pe scaun cu fața spre o sursă de lumină, gâtul în ușoară extensie;
- se introduce tamponul printr-o nară de-a lungul planșeului nazal până ce atinge peretele posterior al nazofaringelui;
- se rotește ușor tamponul, pentru a-l încărca (nu este nevoie de a introduce tamponul și în cealaltă nară);
- pentru creșterea cantității prelevatului și a ratei de izolare, se poate retrage ușor tamponul și reinsera pe același traiect (prima tamponare stimulează secreția);
- la sugari este indicat aspiratul nazofaringian pe cale per-nazală. Acesta se recoltează cu o sondă Nélaton introdusă printr-o nară și adaptată la o seringă etanșă de 20 ml;
- tamponul se introduce în mediul de transport Amies sau Amies cu cărbune;
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim se permite o reținere de maxim 24 de ore.

4.5. Secretul sinuzal

Indicații

✓ Rinosinuzită bacteriană acută

Persoanele nespitalizate:

- depistarea agenților microbieni ca: *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* (mai frecvent la copiii mici), *Haemophilus spp.*, *Staphylococcus aureus*, streptococi grup „anginosus” (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* și *Streptococcus intermedius*), alți streptococci α -hemolitici, streptococul β -hemolitic grup A;
- anaerobi (rar la copii).

Persoanele spitalizate:

- cu traumatisme craniene sau intubație nazotraheală/nazogastrică prelungită: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, deseori infecții polimicrobiene;
- pacienții imunocompromiși: *Pseudomonas aeruginosa*, fungi din genul *Aspergillus* (în special, *Aspergillus flavus*), *Rhizopus* și *Mucor*.

cor, *Sporothrix schenkii* și *Scedosporium apiospermum*, *Candida* spp. și *Cryptococcus neoformans*.

✓ **Rinosinuzită bacteriană cronică**

- depistarea agenților microbieni ca: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, streptococi grup „anginosus”, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., anaerobi ca *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. și alte bacterii anaerobe Gram negative.

Rinosinuzita bacteriană cronică se poate dezvolta postoperatoriu, la persoanele cu sindromul de imunodeficiență congenitală sau cu vegetații adenoide.

Mod de recoltare și transportare

- secretul sau lavajul se colectează aseptice în recipiente sterile;
- proba este prelevată de către medicul specialist otorinolaringolog;
- cantitatea minimă a probei recoltate trebuie să fie de 1 ml (cantitățile mai mari de prelevat vor menține viabilitatea microorganismelor anaerobe un timp mai îndelungat);
- probele trebuie transportate și procesate cât mai curând posibil în maximum 2 ore;
- în cazul anaerobilor, pentru majorarea ratei de izolare, se va utiliza mediul de transport anaerob, care permite prelungirea timpului de transportare maxim 24 de ore.

Notă: Probele recoltate din nazofaringe nu sunt binevenite pentru diagnosticul rinosinuzitei bacteriene, deoarece agenții microbieni izolați din aceste prelevate corelează slab cu rinosinuzita!

4.6. Otoreea

Cauzele inflamației conductului auditiv extern și urechii medii sunt foarte variate, de aceea prelevarea se va efectua cu tamponi separate pentru fiecare ureche și respectiv rezultatele vor fi eliberate separat.

Indicații

✓ **Otita externă (infecția conductului auditiv extern)**

- inflamația acută: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, SBH-A, *Vibrio alginolyticus*;
- inflamația cronică: *Candida* spp., diverși fungi, micobacterii, enterobacterii, nocardii.

- „urechea înotătorului“: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, anaerobi în infecțiile polimicrobiene;
- otita externă malignă (în special la pacienții cu diabet zaharat, imunocompromiși), cel mai frecvent cauzată de *P. aeruginosa*.

Mod de recoltare și transportare

- în cazul otitei externe, eliminările otice, sero-sangvinolente sau purulente din conductul auditiv extern se prelevează cu tampon steril și se introduc în mediul de transport Amies sau Amies cu cărbune;
- dacă este suspectată o infecție fungică, cauza fiind exscoriația pielii, se indică efectuarea frotiului;
- în fișa de trimitere se va indica tipul investigației solicitate și urechea din care s-a recoltat prelevatul;
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere până la 24 de ore.

✓ **Otita acută medie**

- În otite medii acute și cronice depistarea oricărui agent microbial este relevantă. Cel mai frecvent sunt implicați *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *M. catarrhalis*, mai rar *Alloiococcus otitidis*, *S. aureus*/MRSA, SBH-A, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* și anaerobi.

Mod de recoltare și transportare

- recoltarea se va efectua de către medicul specialist. Dacă acest lucru nu este posibil, se recomandă ca asistentul care efectuează recoltarea să aibă un instructaj minim privind precauțiile de recoltare efectuate de către medicul ORL;
- exsudatul se aspiră prin timpanocenteză și este transportat timp de 2 ore la laborator;
- pacientul este așezat pe scaun cu urechea îndreptată spre sursa de lumină;
- se va introduce cu grijă tamponul în conductul auditiv extern și se rotește. Dacă secreția este foarte abundentă, se recomandă ștergerea secreției scurse în pavilion cu un tampon steril și apoi recoltarea exsudatului;
- în caz de perforare spontană a timpanului, exsudatul se va preleva cu un tampon fin steril, ghidat printr-un specul auricular către fistulă;

- în fișa de trimitere se va indica tipul investigației solicitate și urechea din care s-a recoltat prelevatul;
- transportarea probelor se efectuează în mediu de transport, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere de maxim 24 de ore.

4.7. Abcese ale cavității bucale

De obicei, prezintă etiologie polimicrobiană, cu implicarea agenților microbieni aerobi și anaerobi din cavitatea bucală. Cu toate acestea, de rutină se testează prezența următoarelor specii bacteriene: *Staphylococcus aureus*, SBH-A, *Haemophilus influenzae*.

Mod de recoltare și transportare

- recoltarea se face cu ajutorul unui tampon steril, care se introduce în mediul Amies sau Amies cu cărbune, pentru a pune ulterior în evidență agenții patogeni.
- transportarea probelor se efectuează în mediul menționat, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere până la 24 de ore.

4.8. Secreția epiglotică

În epiglotite cel mai frecvent este izolat *Haemophilus influenzae* serotip b, urmat de *Staphylococcus aureus* și SBH-A.

Mod de recoltare și transportare

- probele se recoltează prin aplicarea tamponului steril pe mucoasa epiglotitei, utilizându-se mediul Amies;
- transportarea probelor recoltate în abcese ale cavității bucale și epiglotite se efectuează în mediul Amies, în interval de maximum 2 ore de la recoltare la temperatura camerei. În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim, se permite o reținere până la 24 de ore.

4.9. Secrețiile tractului respirator inferior

Secrețiile din tractul respirator inferior pot fi contaminate cu bacterii din tractul respirator superior. Prin urmare, extrem de important în diagnosticul infecțiilor tractului respirator inferior este recoltarea corectă a materialelor ce provin din partea inferioară a tractului respirator.

Prelevatele relevante pentru diagnosticul infecțiilor tractului respirator inferior includ sputa, aspirate bronșice, endotraheale, lavaj bronhoalveolar, material biptic.

La interpretarea rezultatului examenului bacteriologic se va ține cont de contextul clinic al pacientului și de datele altor testări.

Dovezile clinice pun la baza determinării caracterului adecvat (calității) al probelor primare nesterile, cum ar fi sputa și lavajul endotraheal (AET), LBA, efectuarea preparatului Gram.

Calitatea materialului de cercetare se stabilește prin evaluarea anumitor criterii:

- **Numărul de celule epiteliale (CE) și/sau neutrofile polimorfonucleate (PMN) prezente** în câmpul vizual (estimat prin examinarea microscopică a 10 câmpuri vizuale, puterea de mărire 10x10). Proba adecvată este considerată **<10 CE și > 25 PMN** într-un singur câmp vizual.
- **Raportul dintre neutrofile și celulele epiteliale** este important în stabilirea calității probei și exclude eroarea distribuției inegale a celulelor în timpul pregătirii preparatului. În cazul raportului **PMN:CE > 2:1** - probele sunt considerate adecvate, în caz contrar proba este rebutată.
- Un număr mare de celule epiteliale sugerează contaminarea cu secreție orofaringiană, iar microorganismele fagocitate din PMN într-un preparat Gram indică infecția.
- La pacienții imunocompromiși, trebuie luată în considerare posibilă neutropenie, care va afecta numărul de PMN din tractul respirator.
- Criteriul minim pentru necoresponderea probelor este **numărul de CE >10** per câmp vizual (puterea de mărire 10x10).

Sputa (inclusiv probele obținute prin tub endotraheal, traheostomie)

Sputa este produsă de către epitelocitele tractului respirator. La persoanele sănătoase, sputa se produce în cantități minime, în timp ce diverse stări patologice pot crește secreția sau pot modifica caracterul sputei. Examinarea sputei ne poate ajuta la precizarea diagnosticului și la stabilirea tacticii terapeutice în diverse patologii.

Microflora indigenă din tractul respirator superior în majoritatea cazurilor poate contamina probele prelevate din tractul respirator inferior și nu oferă informație relevantă privind rolul bacteriilor, precum *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* și *Moraxella catharalis* în infecțiile tractului respirator inferior. În scopul diagnosticului microbio-

logic al infecțiilor tractului respirator inferior, al otitei medii și sinuzitei, ghidurile internaționale recomandă colectarea probelor prin metode invazive (aspiratul nazofaringian, aspiratul bronșic, aspiratul endotraheal etc.). Ca alternativă în colectarea sputei de la copiii cu vârsta mai mică de 5 ani și în cazul copiilor cu întârziere în dezvoltare, indiferent de vârstă studiile recomandă tehnica de aspirație nazofaringiană (vezi Anexa 2). La copiii cu tub endotraheal sau traheostomie, sputa poate fi ușor aspirată din trahee. Adolescenții și copiii mai mari sunt de obicei, capabili să producă un specimen de spută prin tuse, dacă li se oferă instrucțiuni clare.

Metodologia recoltării: Se explică pacientului diferența dintre spută, salivă și secreția rinofaringiană înghițită și expectorată.

Sputa emisă spontan se recoltează dimineața, când schimbarea poziției corpului din clino- în ortostatism favorizează eliminarea secrețiilor bronșice. Pacientul elimină secrețiile nazofaringiene, clătește abundant gura și efectuează gargară profundă cu soluție fiziologică sterilă. Sputa se obține după o inspirație profundă de câteva ori și apoi se expectorează prin tuse în recipient steril, cu capac închis etanș. Volumul necesar de prelevat este ≥ 2 ml (minimum 1 ml).

Sputa indusă. Dacă pacientul nu poate tuși spontan, se efectuează inhalatii cu soluție fiziologică încălzită sau soluție salină hipertonică (3-15%) timp de 10-20 de minute. Datele din literatură denotă că sputa indusă nu este deosebit de utilă, cu excepția detectării *P. jirovecii* și *M. tuberculosis*.

De la pacienți cu tub endotraheal se aspiră secreție în recipient steril, în condiții aseptice. Vârfurile de tuburi endotraheale obținute de la nou-născuți se plasează în recipiente sterile și se transportă imediat la laborator. Nu se acceptă vârfuri de tuburi endotraheale de la adulți, deoarece acestea se contaminatează frecvent și bacteriile izolate nu corespund cu agentul etiologic.

Laboratorul respinge prelevatele care nu corespund calitativ macroscopic (salivă) și microscopic.

Secretul endotraheal (AET)

La pacienții intubați, conținutul endotraheal este aspirat cu un cateter steril. Există riscul contaminării probei cu secrețiile din cavitatea bucală.

AET trebuie recoltat numai dacă pacientul e suspectat cu pneumonie, deoarece traheostoma este colonizată la 24 de ore după inserție și semnificația clinică a microorganismelor izolate este dificil de interpretat.

Probele obținute prin bronhoscopie

Deși probele sunt prelevate prin metodă invazivă, este posibilă contaminarea lor cu microbiota orală.

Lavaj bronhoalveolar (LBA)

Proba obținută provine din bronșiole și alveole distale, vizate din zona afectată de infecție. Este necesar să se recolteze cel puțin 1 ml de prelevat.

Lavajul bronhoalveolar (LBA) reprezintă o procedură medicală (investigație paraclinică) prin care bronhoscopul este introdus pe cale orală sau nazală în plămân, cu introducerea de lichid la nivelul regiunii pulmonare investigate și apoi aspirarea acestui lichid pentru examinare. Este o metodă puțin invazivă care permite examinatorului recoltarea de celule, particule anorganice sau agenți patogeni de la nivel bronho-alveolar pentru diagnosticarea diferitelor boli respiratorii.

Indicații

- ✓ diagnosticarea infecțiilor respiratorii la persoane imunocompromise;
- ✓ pneumonie asociată ventilației mecanice;
- ✓ cancer bronhopulmonar;
- ✓ boli pulmonare interstițiale;
- ✓ stabilirea compoziției proteice a căilor aeriene, în cercetări imunologice pentru obținerea de mostre celulare (exemplu: celule T) și pentru o evaluare cantitativă a patogenilor de la nivel pulmonar (exemplu: virusul gripal).

LBA, lavajele bronșice se efectuează când examenul microbiologic al sputei nu evidențiază agentul etiologic al unei pneumonii sau când pacientul nu poate expectora spută. Lavajul este potrivit în special pentru detectarea *P. jiroveczi* sau fungilor.

Se recoltează aprox. 15-20 ml secreție în recipiente sterile cu capac închis etanș. În lipsa bronhoscopului se efectuează lavaj bronșic orb.

În cazul în care nu se obține o cantitate suficientă de material pentru testare, se extrage canula și se taie vârful care conține o anumită cantitate de lichid și se transferă aseptice într-un recipient steril. Se indică în fișa de trimitere denumirea materialului de cercetare: lavaj bronșic.

Lavajul bronșic - proba se obține din căile respiratorii principale (vezi AET).

Periajul bronșic protejat (PBP) este de fapt o biopsie țintită realizată printr-o minusculă perie flexibilă la extremitatea unui fir rigid protejat de cateterul telescopat (prelevat valoros pentru o investigare virusologică și citologică).

Biopsie tisulară. Fragmentul de țesut obținut intraoperator se introduce aseptice în recipient steril.

Transportarea probelor

1. Prelevate nesterile (spută, ETA, LBA, spălătura bronșică)

Prelevatele trebuie transportate într-un recipient steril la temperatura camerei și procesate cât mai curând posibil, în interval de maximum 2 ore de la recoltare.

În caz că proba nu poate fi transportată în acest timp optim se permite refrigerarea probei (+4°C, maxim 24 de ore.). Proba ce constituie vârf de canulă cu secreție, se acoperă cu soluție fiziologică sterilă și se refrigerază. În fișa de trimitere se menționează: probă refrigerată și durată.

Notă: Atenție, la refrigerarea prelevatului, *S. pneumoniae* și *H. influenzae* își pierd viabilitatea.

2. Materialele de cercetare sterile

Probele trebuie transportate în laborator cât mai curând posibil, într-un recipient steril.

În caz că proba nu poate fi transportată imediat, aceasta poate fi păstrată la temperatura camerei până la 24 de ore, de preferință în mediu anaerob.

Fragmentele de țesut obținute prin biopsie tisulară trebuie plasate în câteva picături de soluție fiziologică sterilă, pentru a menține umeditatea acestora.

Deși multe boli respiratorii sunt infecții de origine virală, autolimitate, care se tratează simptomatic, este necesară diferențierea lor de cele bacteriene, cu identificarea agentului cauzal într-un stadiu de debut al bolii (Anexa 3). Aceste acțiuni sunt necesare pentru a indica un tratament antimicrobian eficient și măsuri corespunzătoare de control al infecției.

În ultimii ani, diagnosticul infecțiilor respiratorii a evoluat în mod substanțial odată cu dezvoltarea și disponibilitatea testelor pentru identificarea tulpinilor noi de agenți microbieni.

Metodele inovative de laborator sunt rapide, sensibile și specifice și înlocuiesc treptat metodele convenționale.

5.1. Metode non-moleculare de detecție și identificare a virusurilor respiratorii

Microscopie electronică

Microscopia electronică este una dintre cele mai vechi metode de examinare directă care a fost implementată atât pentru diagnosticul infecțiilor virale, cât și pentru studierea ultrastructurii virusurilor. Această metodă este laborioasă și costisitoare (TAT 3-6 de ore).

Cultivarea virusurilor

Detectarea virusurilor prin punerea în evidență a efectului citopatic și a hemadsorbției în cultura celulară a fost considerată „standardul de aur” pentru diagnosticul virusurilor respiratorii. Virusurile precum Adenovirus, virusurile gripale A/B, RSV și virusul parainfluenza uman sunt cele mai frecvente virusuri respiratorii care sunt izolate în culturi celulare (TAT 24 de ore).

Depistarea Antigenului Viral

Teste imunologice rapide (TIR)

TIR pot furniza rezultate în mai puțin de 30 de minute și sunt de obicei efectuate la patul bolnavului (POC – Point of Care), permițând clinicianului să intervină rapid în algoritmul decizional clinic. Dintre cele patru formate de TIR primare (latex-aglutinarea, dispozitive cu flux orizontal, dispozitive cu flux lateral și imunologice), testul imunologic cu flux lateral (LFIA) este cea mai utilizată metodă imunocromatografică, sensibilitatea variind între 15-80%.

Teste de depistare imunofluorescentă

Testele de detecție a antigenilor virali, prin metoda imunofluorescentă, din prelevatele nazofaringiene sunt considerate a fi rapide și fiabile pentru detectarea infecțiilor virale respiratorii. Sensibilitatea acestor teste variază între 35-85%.

Teste serologice de detecție a anticorpilor

Anticorpilor specifici agenților patogeni apar, de obicei, la aproximativ 2-3 săptămâni de la debutul infecției și pot fi detectați prin teste serologice. Testele serologice detectează anticorpilor împotriva majorității agenților patogeni ce provoacă infecții respiratorii, cum ar fi RSV, adenovirus, virul gripal A și B, virusul parainfluenza. Cu toate acestea, s-a raportat că testele serologice pentru detectarea virusului parainfluenza și adenovirusului sunt mai puțin sensibile, din cauza reacțiilor încrucișate, comparativ cu metodele moleculare.

5.2. Metode moleculare de detecție a microorganismelor

Prin metodele moleculare, din materialul de cercetare a tractului respirator pot fi detectați numeroși agenți patogeni. Dezvoltarea acestor metode a permis obținerea rezultatelor în câteva ore, respectiv stabilirea unui diagnostic rapid. Metodele moleculare sunt mai rapide, decât metodele convenționale și, de obicei, sunt și mai sensibile, având un impact semnificativ asupra deciziilor de tratament.

Detecția precisă a virusurilor respiratorii prin metode moleculare nu depinde numai de etapa analitică, dar este influențată în mod critic și de tipul, cantitatea și calitatea probelor colectate. Pot fi mai multe tipuri de testări moleculare: PCR RT single plex, multiplex, PCR rapid POC (Point of Care) etc.

Studiile au raportat un randament de diagnostic crescut (60% față de 35%), sensibilitate considerabil mai mare (80-100%) și specificitate (82-100%) pentru tehnicile de testare moleculară, comparativ cu metodele de diagnostic convenționale, cum ar fi metodele imunofluorescente, izolarea virusurilor, etc.

Testarea sindromică* care poate depista simultan mai mulți agenți patogeni este benefică pentru controlul infecției, deciziile de tratament în timp util și sunt substanțial mai puțin costisitoare decât detectarea agenților patogeni individuali de PCR RT monoplex.

Panelul pentru testarea sindromică poate detecta atât infecții bacteriene, cât și coinfecții virale-bacteriene, ceea ce este vital pentru managementul corect al acestor infecții și al strategiilor eficiente de preve-

nire. Aceste paneluri pot detecta ~20 de agenți patogeni, în funcție de dimensiunea panelului, timpul de testare fiind de cca 1-2 ore.

În comparație cu alte metode moleculare bazate pe NAAT (eng. Nucleic Acid Amplification Test), panelul sindromic multiplex demonstrează performanțe comparabile, sensibilitate și specificitate înaltă, variind individual pentru fiecare agent microbian.

Studiile recente au demonstrat că testarea moleculară îmbunătățește considerabil diagnosticul infecțiilor respiratorii și în plan mondial este considerată un nou „standard de aur”.

**Abilitatea de a testa simultan o gamă largă de agenți patogeni atunci când un pacient prezintă un set de simptome clinice care nu sunt specifice unui anumit agent patogen.*

5.3. Detecția bacteriană

Sunt metode rapide de detecție a streptococilor, cu rezultate între 7-70 min, dar au o sensibilitate mai mică de 90% și o specificitate < 98%.

Standardul de aur rămâne a fi metoda bacteriologică, care oferă o sensibilitate >90-95% și o specificitate >98%, în schimb testarea durează mai mult timp (cca 48-72 de ore), comparativ cu metodele moleculare sau alte metode rapide.

Utilizarea combinată a metodelor rapide cu cele convenționale oferă o soluție optimă în indicarea tratamentului empiric antibacterian cu ajustarea ulterioară a acestuia, la necesitate.

5.3.1. Materialul oral

Materialul oral de cercetare se va cultiva pe mediile și cu respectarea condițiilor redată în Tabelul 2.

Tabelul 2. Cultivarea probelor din cavitatea orală

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura, °C	Condiții de mediu	Timpul		
Candidoza orală	Agar Sabouraud	35-37	aerobe	40-48 de ore	după 24 și 48 de ore	<i>C. albicans</i>
Ulcer în cavitatea bucală	Agar sânge (sânge de berbec), Agar Sabouraud	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	după 24 și 48 de ore	SBH-A, <i>S. aureus</i> , fungi

În cazul izolării *Candida* spp. identificarea speciei și testarea la antifungice se face individual pentru fiecare pacient, la indicațiile clinicianului.

Particularități specifice ale microorganismelor frecvent implicate în ITR sunt date în Anexa 4.

5.3.2. Secreție nazală

Materialul de cercetare se va cultiva pe mediile și cu respectarea condițiilor redată în Tabelul 3.

Tabelul 3. Cultivarea probelor din cavitatea nazală

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura, °C	Condiții de mediu	Timpul		
Purtători de <i>S. aureus</i>	Agar sânge (5% sânge de berbec)/ Mannitol Salt Agar	35-37	aerobe	16-24 ore MS 48 de ore	≥16 h; MS după 48 de ore	<i>S. aureus</i>
Purtător de MRSA	Agar cromogen pentru MRSA	35-37	aerobe	16-24 de ore; pe substrat selectiv 48 de ore	≥16-24 de ore; pe substrat selectiv după 48 de ore	MRSA
	bulion nutritiv cu 2,5% NaCl + subcultivare pe Agar cromogen pentru MRSA					
Purtător de Streptococi grup A	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	5-10% CO ₂	16-24 de ore	16 ore	Streptococi grup A
În cazuri rare, se adaugă:						
Rinoscleroma/ozena	Agar MacConkey/CLED	35-37	aerobe	16-24 de ore	≥16 ore	<i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. ozaenae</i>

Microorganisme cu rezistență neobișnuită sau neașteptată (de ex. VRSA) și în cazurile dubioase trebuie trimise la laboratorul de referință.

5.3.3. Exsudatul faringian

Materialul de cercetare se va cultiva pe mediile și cu respectarea condițiilor redată în Tabelul 4.

Tabelul 4. Cultivarea probelor din faringe

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim- pul		
Faringită Epiglotite Amigdalite Laringite	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	5-10% CO ₂	18-24 ore	după 18 ore	Streptococi grup A, C și G
În cazuri specifice:*						
Faringită membranoasă/ Amigdalite Călătorii peste hotarele țării	Tinsdale, Hoyle	35-37	aerobe	24-48 de ore	după 24 și 48 de ore	Tulpini toxigene: <i>C. diphtheriae</i> <i>C. ulcerans</i>
Gonoree Sursă de <i>N. meningitidis</i> sau persoană care a fost în contact	Agar ciocolată pentru gonococ, Agar ciocolată selectiv	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	≥ 40 de ore	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i>
Amigdalite Faringite și erupții cutanate	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	≥ 48 de ore	<i>A. haemolyticum</i>
Epiglotite	Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	24-48 de ore	zilnic	<i>H. influenzae</i>
Portaj de <i>S. aureus</i> (MSSA)	Agar sânge (5% sânge de berbec)/ Mannitol Salt agar sau agar cromogen	35-37	aerobe	18-24 de ore	≥18 ore	<i>S. aureus</i>
Diabet Imunodeprimați Candidoză orală	Agar Sabouraud	35-37	aerobe	40-48 de ore	≥ 40 de ore	Micete

* La indicațiile clinicianului sau când agentul este specificat în fișa de trimitere.

Managementul faringitei acute este redat în Anexa 5.

Angina Plaut-Vincent-Simanovschi sau angina ulcero-necrotică se caracterizează prin afectarea unilaterală a amigdalelor palatine și uneori ca inflamații severe ale gingiilor, fiind cauzată de asociații de fusobacterii anaerobe și *Borrelia vincentii*. Diagnosticul se bazează pe simptomele clinice și frotiu Gram.

5.3.4. Secreția nazofaringiană

Tabelul 5. Cultivarea probelor nazofaringiene pentru izolarea bordetelelor

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Timpul		
tuse convulsivă/ parapertusis	Bordet-Gengou/ Regan-Lowe	35	aerobe, umiditate	7 zile	4 zile și 7 zile	<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertusis</i>

Plăcile trebuie plasate într-o atmosferă umedă aerobă la o temperatură de 35°C (temperatura de 37°C nu permite creșterea unor tulpini de *B. pertussis*).

Cultivarea probelor nazofaringiene pentru izolarea *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* și SBH-A

- Modul de cultivare este identic cu cel al probelor faringiene (Tabelul 4).

5.3.5. Secretul sinuzal

Materialul de cercetare se va cultiva pe mediile și cu respectarea condițiilor redată în Tabelul 6.

Tabelul 6. Cultivarea probelor din sinusurile paranasale

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Timpul		
Rinosinuzita acută supurată	Agar sânge (5% sânge de berbec), Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	zilnic	Streptococci β-hemolitici, enterobacterii <i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>S. aureus</i> <i>S. anginosus</i> grup <i>S. pneumoniae</i>

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim-pul		
	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	anaerobe	5-7 zile	≥48 de ore zilnic	Anaerobi: <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.
	Agar Sabouraud	30 și 35-37	aerobe	5 zile	≥40 de ore zilnic	Fungi
În cazuri specifice:						
dacă microscopic se suspectează infecție mixtă	Agar Mac-Conkey	35-37	aerobe	16-24 de ore	≥16 ore	enterobacterii <i>Pseudomonas</i> spp.

Examenul microscopic

- Din proba cu aspect purulent - se prepară frotiu Gram;
- Din proba cu aspect apos - se centrifughează, apoi din sediment se prepară frotiu Gram.

5.3.6. Otoreea

Materialul de cercetare se va cultiva pe mediile și cu respectarea condițiilor redată în Tabelul 7.

Tabelul 7. Cultivarea probelor colectate în otite

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim-pul		
Otita externă						
Otită externă	Agar sânge (5% sânge de berbec), Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	zilnic	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , SBH-A, <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i>
În cazul infecției cronice se adaugă:						
Otită cronică externă	Agar Mac-Conkey	35-37	aerobe	16-24 de ore	≥16 ore	<i>Pseudomonas</i> spp., enterobacterii
	Agar Sabouraud	35-37	aerobe	40-48 de ore	≥40 de ore	fungi

Tabloul clinic/indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim-pul		
În cazuri specifice se adaugă:						
„Urechea înotătorului“	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	anaerobe	48 de ore	≥ 40 de ore	anaerobi
Otita medie						
Exsudat din urechea medie/tampon din urechea medie	Agar sânge (5% sânge de berbec), Agar ciocolată	35-37	5-10% CO ₂	7 zile	zilnic	orice microorganism*
	Agar sânge (5% sânge de berbec)	35-37	anaerobe	7 zile	≥40 de ore zilnic	anaerobi

*Orice microorganism care crește pe placa de mediu este considerat semnificativ, deoarece acestea sunt probe colectate prin metode invazive și prelevatul se consideră a fi steril. La etapa de interpretare a rezultatelor se ia în calcul posibilitatea de contaminare a canalului auditiv cu microflora tegumentului.

5.3.7. Secrețiile tractului respirator inferior

Microscopia

Micropreparat din LBA, AET, spută

- Din fragmentele mucopurulente/hemoragice ale probei se prepară frotiul Gram.
- Proba cu aspect lichid se centrifughează și din sediment se prepară frotiul Gram (microscopie 10x10).
- Se raportează numărul de CE (<10, 10-25, >25), PMN (<10, 10-25, >25) (vezi mai sus) și se indică cantitatea (puțin, moderat, mult) și tipul de microorganisme puse în evidență;
- Dacă se pune în evidență >10 CE într-un câmp, în frotiul efectuat din spută (după examinarea a 10 câmpuri) eșantionul trebuie respins, comunicând verbal medicului clinician sau scriind în concluzie: **Probă de calitate joasă ce provine din tractul respirator superior.** Înainte de a respinge proba, calitatea ei trebuie evaluată prin microscopierea unui preparat efectuat din trei locuri, cele mai suspectate (de ex. puroi).
- Dacă în micropreparat sunt determinate date cu importanță clinică semnificativă (puține CE, un număr mare de PMN, dominația unui tip de bacterii fagocitate în PMN), această constatare trebuie raportată medicului clinician în aceeași zi.

5.4. Determinarea cantitativă a microorganismelor din spută, AET și prelevate obținute prin bronhoscopie

Sputa

Specimenele examinate doar macroscopic nu trebuie respinse, însă se va indica aspectul utilizând următorii termeni: mucoasă, mucopurulentă, purulentă, sangvinolentă.

În cazul sputei neomogene sau vâscoase se recurge la fluidificarea ei prin suplimentare a unui volum egal de soluție proaspătă 0,5 % de N-acetil- L-cisteină sterilă. Se urmăresc instrucțiunile producătorului pentru adăugarea unei soluții 0,1% de ditiotreitol sau N-acetil L-cisteină (NALC) la spută.

Notă: eșantioanele mucoide se tratează ca sputa.

Se inoculează 1μl cu ansa sterilă din diluția finală preparată (10 μl de spută omogenizată în 5 ml de apă distilată sterilă) pe fiecare tip de placă de mediu (vezi Tabelul 8).

Pentru FC și pacienții imunocompromiși, de asemenea, se inoculează 1 μl din diluția sputei mai concentrată pe aceleași plăci. Diluțiile pot fi inoculate pe jumătate de plăci, pentru a permite o comparație mai ușoară a creșterii.

Pentru pacienții cu fibroză chistică, care nu au avut o colonizare anterioară de *B. cepacia*, se inoculează 100 μl de spută lichefiată pe o placă de mediu selectiv pentru *B. cepacia* și se repartizează inoculul pe întreaga suprafață a plăcii de agar.

Tabelul 8. Medii de cultură, condiții și microorganisme relevante pentru probe de spută

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim-pul		
Bronșită Boala cronică obstructivă a căilor respiratorii Pneumonie dobândită în comunitate Pneumonie achiziționată în spital	Agar ciocolată + disc de Bactracină	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	zilnic	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Alte microorganisme în creștere pură pot fi semnificative

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citirea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Tim-pul		
În anumite situații, este necesar să se adauge:						
Bronșectazie	CLED/Agar MacConkey	35-37	aerob	40-48 de ore	zilnic	<i>Enterobacteriaceae</i>
Fibroză chistică	Agar Manitol Salt/Cromogen	35-37	aerob	40-48 de ore	zilnic	<i>Pseudomonas spp.</i>
Imuno-compromiși	Agar Sabouraud	35-37	aerob	40-48 de ore*	≥40 h	fungi
Fibroză chistică	Mediu selectiv pentru <i>B. cepacia</i>	35-37	aerob	5 zile	zilnic	<i>B. cepacia</i> complex
	Medii pentru micobacterii netuberculoase solide sau lichide (de ex. NTM agar**)	30±2	aerob	28 de zile	La 4, 7, 14, 28 de zile	Micobacterii netuberculoase*** (<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacteroides abscessus</i> , <i>Mycobacteroides chelonae</i> , <i>Mycobacterium goodii</i>)
Micoze	Agar Sabouraud	35-37	aerob	40-48 de ore*	≥40 h	fungi
<i>Legionella</i>	Agar selectiv <i>Legionella</i>	35-37	Umiditate sporită	Până la 10 zile	La 3, 7 și 10 zile	<i>Legionella spp.</i>

*Poate fi necesară o incubare de până la 6 săptămâni, în cazul izolatelor fungice (dacă sunt suspecți agenți patogeni dimorfi); probele vor fi citite inițial la 40 de ore, apoi reincubate.

**NTM agar - condițiile indicate în tabel sunt doar pentru acest mediu, alte medii necesită alte condiții și alt timp de incubare (de ex. Middlebrook 7H9, LJ - incubarea timp de minim 6-8 săptămâni la temperatura de 35-37°C).

***Identificarea micobacteriilor netuberculoase se realizează prin: ex. MALDI-TOF, PCR.

LBA și AET

Probele contaminate cu microbiota orală sunt însămânțate cantitativ, pentru a diferenția contaminanții de microflora implicată în proces.

Proba prelucrată cantitativ nu este centrifugată înainte de însămânțare. Dacă proba este lichidă, inițial se efectuează cultivarea pe plăci, apoi se centrifughează pentru prepararea frotiului Gram.

LBA

Se centrifughează LBA la 1200xg timp de 10 minute.

Se înlătură tot supernatantul, cu excepția a 0,5 ml, și se resuspendează în sedimentul rămas.

Folosind o ansă sterilă, se inoculează fiecare placă de agar cu depozitul probei centrifugate.

Metoda semicantitativă

LBA centrifugat este resuspendat în lichid și se fac trei diluții seriale (1/10, 1/1000 și 1/100 000). Din fiecare diluție se inoculează câte 0,1 ml, conform Tabelului 9.

Se analizează particularitățile culturale și se cuantifică fiecare morfotip prezent, exprimându-se în unități formatoare de colonii.

În mod alternativ, se utilizează o ansă calibrată. Pentru eșantioanele lichide de LBA, se utilizează anse calibrate cantitative destinate pentru administrarea de 0,01 și 0,001 ml. După incubare, se calculează coloniile și se determină numărul de UFC pe mililitru prin înmulțirea numărului de colonii cu factorul de diluare.

Notă: Inocularea plăcilor de agar trebuie efectuată imediat după diluarea probei.

Pragul diagnostic este:

- 10^5 - 10^6 UFC/ml pentru aspirate bronhoscopice,
- 10^3 UFC/ml pentru PBP și
- 10^4 UFC/ml pentru LBA.

Pragul de diagnostic nu poate fi atins la etapa inițială a procesului infecțios sau dacă este prezentă bronșiolita infecțioasă. Eșantioanele de la pacienții care au primit antibiotice pot da, de asemenea, rezultate fals-negative.

ETA

Proba prelucrată cantitativ nu e centrifugată înainte de însămânțare. Dacă proba e lichidă, după însămânțare se centrifughează pentru prepararea micropreparatului (vezi mai sus).

- **Un număr semnificativ de bacterii (UFC /ml):**
 - ✓ **AET $\geq 10^5$ UFC/ml**
- Metoda cea mai simplă, este însămânțarea cu ansa calibrată (10 μ l), care aplică 0,01 ml de probă pe plăci (vezi Tabelul 9).

Această metodă face dificilă citirea unui număr mare de colonii ($\geq 10^5$) și se recomandă inocularea AET după diluția probei 1:10 sau proba se inoculează nediluată cu ansa de 1 μ l. În acest caz, creșterea a >100 de colonii înseamnă 10^5 UFC/ml de prelevat, ceea ce reprezintă o creștere semnificativă pentru AET (vezi Tabelul 10).

Numărul de colonii dintr-o probă de 1 ml poate fi determinat cu o exactitate mai înaltă, diluând proba de 20 de ori în modul următor:

- 0,5 ml de probă se diluează cu 9,5 ml de soluție fiziologică;
- 50 µl de probă diluată este însămânțată pe placa de mediu.

Numărul de colonii crescute se indică conform datelor din Tabelul 11.

Tabelul 9. Medii de cultură, condiții și microorganisme relevante pentru probe LBA

Tabloul clinic/ indicații	Mediu standard	Incubația			Citierea probei	Identificarea microorganismului
		Temperatura °C	Condiții de mediu	Timpul		
Bronșită Boala cronică obstructivă a căilor respiratorii Pneumonie dobândită în comunitate Pneumonie achiziționată în spital	Agar ciocolată + disc de Bacitracină	35-37	5-10% CO ₂	40-48 de ore	zilnic	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Alte microorganisme în cultură pură pot fi semnificative
	Agar Sabouraud	35-37	aerobe	5 zile*	≥40 de ore	Fungi
	CLED/Agar MacConkey	35-37	aerobe	40-48 ore	zilnic	Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i>
În anumite situații, este necesar să se adauge:						
Bronșectazie, Fibroză chistică	Agar Manitol Salt/Cromogen	35-37	aerob	40-48 de ore	zilnic	<i>S. aureus</i>
	Medii pentru micobacterii netuberculoase solide sau lichide (ex. NTM agar**)	30±2	aerob	28 zile	La 4, 7, 14, 28 de zile	Micobacterii netuberculoase*** (<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacteroides abscessus</i> , <i>Mycobacteroides chelonae</i> , <i>Mycobacterium goodii</i>)
Fibroză chistică	Mediu selectiv pentru <i>B. cepacia</i> selectiv	35-37	aerob	5 zile	zilnic	<i>B. cepacia complex</i>
Pneumonie sau simptome asemănătoare celor gripale	Agar selectiv <i>Legionella</i>	35-37	Umiditate sporită	Până la 10 zile	La 3, 7 și 10 zile	<i>Legionella</i> spp.

* Poate fi necesară o incubare de până la 6 săptămâni, în cazul izolatelor fungice (dacă sunt suspectați agenți patogeni dimorfi); probele vor fi citite inițial la 40 de ore, apoi reincubate.

**NTM agar - condițiile indicate în tabel sunt doar pentru acest mediu, alte medii necesită alte condiții și alt timp de incubare (de ex. Middlebrook 7H9, LJ - incubarea timp de minim 6-8 săptămâni la temperatura de 35-37°).

***Identificarea micobacteriilor netuberculoase se realizează prin: ex. MALDI-TOF, PCR.

Notă: Testarea de rutină a urinei la antigenul pneumococic nu este recomandată adulților cu PC, cu excepția celor cu pneumonie comunitară cu o evoluție severă (PCS).

Testarea de rutină a urinei adulților cu PC la antigenul *Legionella* nu se recomandă. Această investigație se efectuează numai în cazurile indicate de factorii epidemiologici, cum ar fi asocierea cu un focar de *Legionella* sau o călătorie recentă.

Ghidurile internaționale recomandă utilizarea metodelor performante și mult mai rapide (ex. PCR RT, PCR multiplex rapid) pentru microorganismele care sunt dificil de identificat prin metoda culturală (*Legionella*, *Chlamidia*, *Bordetella*, fungi, virusuri, etc.). Implementarea acestor metode ar avea un impact major asupra micșorării timpului de raportare (TAT-1 oră) a potențialilor agenți patogeni ai ITR, ceea ce ar permite inițierea unui tratament antimicrobian adecvat în timp util și/sau ajustarea celui empiric.

Alte metode de identificare a microorganismelor sunt:

Spectrometria de masă

MALDI-TOF MS (eng. *Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry*) este o tehnologie nouă de identificare a speciilor de microorganisme utilizată pentru a analiza compoziția proteică a unei celule microbiene. Acest sistem s-a dovedit a fi un instrument mai rapid, exact și rentabil, comparativ cu tehnicile fenotipice convenționale sau metodele moleculare. Datorită simplității de manipulare, obținerea rezultatelor asociate cu costuri minime pentru consumabile este eficientă pentru identificarea de rutină a izolatelor clinice.

Teste comerciale de identificare (de ex : latex-test)

Testele latex de aglutinare sunt utilizate pentru identificarea rapidă și prezumtivă a unor microorganisme din cultură pură sau direct din prelevatele patologice, respectând instrucțiunile producătorului.

Studiile în domeniu recomandă validarea testelor comerciale de identificare de către laboratorul de referință, pentru a demonstra utilitatea acestuia în anumite scopuri.

5.4.1. Diagnosticul infecției cauzate de noul coronavirus

Pandemia COVID-19 are un impact major asupra laboratoarelor de microbiologie. În etapa preanalitică, colectarea biosubstratului corespunzător din locul anatomic adecvat al tractului respirator și în momentul potrivit al infecției este esențială pentru un diagnostic molecular prompt și precis al COVID-19. De o importanță majoră sunt și măsurile adecvate ce trebuie întreprinse pentru a menține în siguranță personalul de laborator, în timp ce se obțin rezultate fiabile ale testelor.

În etapa analitică, metoda de transcriere inversă PCR RT rămâne a fi testul molecular de elecție pentru diagnosticul etiologic al infecției cu SARS-CoV-2, în timp ce tehnicile bazate pe detecția anticorpilor sunt introduse ca instrumente suplimentare.

În etapa postanalitică, rezultatele testării trebuie interpretate cu atenție, folosind atât inovațiile moleculare, cât și cele serologice. În cele din urmă, dispozitivele, ce conțin tehnici integrate (de ex. extracție, amplificare și interpretare într-un singur instrument) cu capacități scalabile, vor facilita diagnosticul și monitorizarea rapidă și precisă a infecțiilor cu SARS-CoV-2 și vor ajuta în mare măsură la controlul acestei infecții. Aceste teste ce oferă rezultate rapide vor fi foarte importante pentru managementul pacientului și deciziile de control și răspuns al infecției, în special atunci când sunt prezente alte forme infecțioase de pneumonie și izolatele respiratorii sunt rare. Aceste teste sunt sigure, simple, rapide și pot fi utilizate în clinicile și spitalele care au deja instrumentele necesare recomandate de ghidurile internaționale și care sunt responsabile pentru identificarea și tratarea acestor pacienți. Sistemele care determină mai mulți agenți patogeni într-o perioadă scurtă de timp contribuie la un diagnostic diferențial standardizat, în principal, pentru a distinge alte virusuri cunoscute în dezvoltarea pneumoniei de genă virală, cum ar fi virusurile gripale, virusul parainfluenza, adenovirusul, virusul sincițial respirator, rinovirusul, metapneumovirusul uman, MERS-CoV etc., de asemenea, pneumonia provocată de micoplasme, hlamidii și alte bacterii. În plus, ar trebui să se distingă de bolile neinfecțioase, cum ar fi vasculita, dermatomiozita și pneumonia în organizare.

Rolul diagnosticului de laborator (Figura 1) la pacienții cu COVID-19 depășește cu mult diagnosticul etiologic și supravegherea epidemiologică, iar testele IVD pot fi utilizate pentru evaluarea severității bolii, definirea prognosticului, monitorizarea pacienților și ghidarea tratamentului.



VIRUSUL: SARS-CoV-2	ALȚI PATOGENI	STAREA GAZDEI ȘI A ORGANELOR ȚINTĂ
<ul style="list-style-type: none"> • Detecție directă: RT- PCR • Detecție indirectă: Serologie (IgM, IgG, IgA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Coinfecție (alte viru- suri, bacterii) • Suprainfecție (bacte- rii, fungi) în princi- pal la pacienții din ATI/pacienți ventilați 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamație • Coagulare • Miocard • Rinichi • Celule sangvine • Ficat •
Diagnosticul etiologic și supravegherea epidemiologică	Diagnostic etiologic	Evaluarea severității, prognostic, monitorizare

Figura 1. Diagnosticul de laborator în managementul pacienților cu COVID-19

La pacienții cu COVID-19 unii parametri de laborator pot fi considerați predictorii semnificativi ai rezultatului clinic advers (vezi Tabelul 10).

Tabelul 10. Principalele modificări ale parametrilor de laborator la pacienții adulți cu progres nefavorabil al COVID-19

Test de laborator	Anormalități	Semnificația clinică potențială
Hemoleucograma completă	Număr crescut de celule albe	Infecție/suprainfecție bacteriană
	Număr crescut de neutrofile	Infecție/suprainfecție bacteriană
	Număr scăzut de limfocite	Răspuns imunologic scăzut către virus
	Număr scăzut de trombocite	Coagulopatie diseminată
Gazele din sânge	Modificări estimate	Important în managementul îngrijirilor critice
Albumina	Scăzută	Afectarea funcției hepatice
Lactat dehidrogenaza	Crescută	Leziuni pulmonare și/sau leziuni extinse ale organelor
Alanin aminotransferaza	Crescută	Leziuni hepatice și/sau leziuni extinse ale organelor
Aspartat aminotransferaza	Crescută	Leziuni hepatice și/sau leziuni extinse ale organelor
Bilirubina totală	Crescută	Leziuni hepatice
Creatinina	Crescută	Leziuni renale
Troponina cardiacă	Crescută	Leziuni cardiace
D-Dimer	Crescut	Activarea coagulării sangvine și/sau coagulopatie diseminată

Test de laborator	Anormalități	Semnificația clinică potențială
Timpul protrombinei	Crescut	Activarea coagulării sangvine și/sau coagulopatie diseminată
Procalcitonina	Crescută	Infecție/suprainfecție bacteriană
Proteina C-reactivă	Crescută	Infecție virală severă/viremie/sepsis viral
Feritina	Crescută	Inflamație severă
Citokine (IL-6)	Crescute	Sindromul furtunii de citokine

Testele rapide de diagnostic bazate pe detectarea antigenului

Actualmente se produc și se comercializează teste rapide care detectează prezența proteinelor virale (antigene) SARS-CoV-2 în prelevatele tractului respirator. Cele mai multe dintre acestea sunt imunoanalize cu flux lateral (LFI), care, de obicei, dau un rezultat în 30 de minute. Spre deosebire de NAAT, nu există o amplificare a țintei detectate, ceea ce face ca testele antigenului să fie mai puțin sensibile. În plus, pot apărea rezultate fals-pozitive (care indică faptul că o persoană este infectată atunci când nu este) dacă anticorpii de pe banda de testare recunosc și antigenii altor virusuri decât SARS-CoV-2, precum alte coronavirusuri umane.

Sensibilitatea acestor teste, comparativ cu PCR RT la exemplarele din TRS (tampoane nazofaringiene) este foarte variabilă, pe când specificitatea este raportată în mod constant ca fiind ridicată. În prezent, datele privind performanța antigenului în cadrul clinic sunt încă limitate, însă atunci când performanța este acceptabilă, testele rapide de detecție a antigenului pot fi implementate într-un algoritm de diagnosticare pentru a reduce numărul de teste moleculare care trebuie efectuate și pentru a sprijini identificarea și gestionarea rapidă a cazurilor de COVID-19. Modul în care detecția antigenului ar fi încorporată în algoritmul de testare depinde de sensibilitatea și specificitatea testului antigenului și de prevalența infecției cu SARS-CoV-2 în populația testată. O încărcătură virală mai mare este asociată cu performanțe îmbunătățite ale testului rapid de detecție a antigenului; prin urmare, performanța testului poate fi cea mai bună în jurul debutului simptomelor și în faza inițială a unei infecții cu SARS-CoV-2.

Testarea anticorpilor

Testele serologice care detectează anticorpii produși de corpul uman ca răspuns la infecția cu SARS-CoV-2 pot fi utile în diverse situații. De exemplu, studiile de serosupraveghere pot fi utilizate pentru a sprijini investigația unui focar în curs de desfășurare și pentru a sprijini evaluarea retrospectivă a ratei de infectare sau a dimensiunii unui focar. Deoarece SARS-CoV-2 este un agent patogen nou, răspunsurile la anti-

corpilor pe care îi generează sunt încă în curs de dezvoltare, prin urmare și testele de detectare a anticorpilor ar trebui utilizate cu precauție și nu utilizate pentru a determina infecțiile acute.

Testele necantitative (de exemplu, testele de flux lateral) nu pot detecta o creștere a titrelor de anticorpi, spre deosebire de testele semicantitative. Testele de detecție rapidă a anticorpilor cu flux lateral nu sunt în prezent recomandate pentru diagnosticul acut și managementul clinic al COVID-19.

Serologia nu trebuie utilizată ca diagnostic independent pentru identificarea cazurilor acute în îngrijirea clinică sau în scopuri de urmărire a contactelor. S-a observat că seroconversia (dezvoltarea răspunsului măsurabil al anticorpilor după infecție) este mai robustă și mai rapidă la pacienții cu boală severă, comparativ cu cei care au avut formă ușoară sau în infecții asimptomatice. Anticorpilor au fost detectați încă de la sfârșitul primei săptămâni de boală la un număr mic de pacienți, dar ei pot dura și săptămâni pentru a se dezvolta la pacienții cu infecție subclinică/ușoară.

Prin urmare, serologia nu este un înlocuitor adecvat pentru testele virologice pentru a informa urmărirea contactelor sau managementul clinic. Durata persistenței anticorpilor generați ca răspuns la SARS-CoV-2 este încă în studiu. În plus, prezența anticorpilor care se leagă de SARS-CoV-2 nu garantează că aceștia sunt anticorpi neutralizanți sau că oferă imunitate de protecție.

Testele serologice disponibile pentru detectarea anticorpilor

Testele comerciale care detectează anticorpilor de legare (Imunoglobulinele totale (Ig), IgG, IgM și/sau IgA în diferite combinații) utilizând diverse tehnici, testul imunosorbent enzimatic (ELISA, ELFA) și imunoanaliza chemiluminescentă (CLIA) au devenit disponibile. Testele de detectare a anticorpilor pentru coronavirus pot, de asemenea, să reacționeze încrucișat cu alți agenți patogeni, inclusiv cu alte coronavirusuri umane, sau cu condiții preexistente (de exemplu, sarcină, boli autoimune) și astfel să dea rezultate fals-pozitive.

Testele de neutralizare a virusului sunt considerate a fi testul standard de aur pentru detectarea prezenței anticorpilor funcționali. Aceste teste necesită personal înalt calificat și facilități de BSL-3 și, prin urmare, nu sunt adecvate pentru a fi utilizate ca teste de diagnostic de rutină.

6 INTERPRETAREA ȘI RAPORTAREA REZULTATELOR

Rezultatele investigațiilor de laborator sunt prezentate în scris/electronic, lizibile, validate de supervisor și sunt raportate persoanelor autorizate. Laboratorul trebuie să dispună de proceduri clare documentate, bune practici pentru interpretarea și eliberarea rezultatelor. Pentru ghidarea tratamentului, rezultatele preliminare sunt transmise în timp util clinicianului prin telefon, fax sau alte legături electronice, ulterior rezultatele fiind confirmate printr-un raport final. Toate rapoartele emise trebuie păstrate ca înregistrări tehnice. Laboratorul trebuie să fie responsabil pentru informația furnizată în raport.

Timpul de raportare a rezultatelor depinde de metoda de diagnostic utilizată.

Interpretarea rezultatelor în funcție de prelevat este redată în Anexa 6.

6.1. Materialul oral

Rezultat negativ, se raportează:

- microorganisme de importanță clinică nu au fost identificate sau proba a fost contaminată cu microflora cavității bucale;
- lipsa creșterii microorganismelor din biosubstratul examinat.

Rezultat pozitiv, se raportează:

- microorganismele enumerate în Tabelul 1, în cazul bacteriilor și antibiograma.

6.2. Secreția nazală

Rezultat negativ, se raportează în funcție de agentul cauzal solicitat:

- nu a fost izolat *S. aureus*/MRSA;
- nu a fost izolată *Klebsiella rhinoscleromatis*/*Klebsiella ozaenae*.

Rezultat pozitiv, se raportează în funcție de agentul cauzal solicitat:

- *S. aureus* (MSSA) fără antibiogramă cu notă: *S. aureus* colonează frecvent mucoasa nazală. Semnificația clinică trebuie consultată cu un medic microbiolog.
- MRSA, cu sau fără antibiogramă (în funcție de indicația medicului clinician);
- *Klebsiella rhinoscleromatis*/*Klebsiella ozaenae*, cu antibiograma.

- *S. pyogenes* fără antibiogramă cu notă: *S. pyogenes* colonează frecvent mucoasa nazală. Semnificația clinică trebuie consultată cu un medic microbiolog.

Timp de raportare

Raportarea urgentă a rezultatelor relevante clinic se va efectua telefonic/electronic imediat ce acestea sunt disponibile. Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat în 16-72 de ore.

6.3. Exsudat faringian

Rezultat negativ, se raportează:

- streptococi β -hemolitici grup A, C și G nu au fost izolați;
- în funcție de maladia sau cauza indicată în Tabelul 2, de ex. nu a fost izolat *Corynebacterium diphtheriae*.

Rezultat pozitiv:

- streptococi β -hemolitici grup A, C și G cu eliberarea antibiogramei;
- alte microorganisme relevante clinic indicate în Tabelul 2, cu eliberarea antibiogramei.

Timp de raportare

Raportarea urgentă a rezultatelor relevante clinic se va efectua telefonic/electronic imediat ce sunt disponibile. La depistarea *N. gonorrhoeae/meningitidis* și *C. diphtheriae/ulcerans*, în mod urgent este contactat medicul clinician prin telefon, înaintea efectuării antibiogramei pentru a întreprinde măsuri corespunzătoare. Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat în 16-72 de ore.

În cazul investigațiilor suplimentare, de ex. rezultatul testării toxicității *C. diphtheriae*, se raportează când acesta este disponibil.

6.4. Secretul nazofaringian

Rezultat negativ, se raportează:

- în funcție de maladia sau cauza indicată în Tabelul 5, de ex. *B. pertussis* nu a fost izolat.

Rezultat pozitiv, se raportează:

- microorganismul solicitat (vezi Tabelul 5), cu eliberarea antibiogramei.

Timp de raportare

- Raportarea urgentă a rezultatelor se va efectua telefonic/electronic imediat ce acestea sunt disponibile.
- Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat imediat ce este disponibil.

6.5. Secret sinuzal

Raportarea rezultatelor microscopiei

Se descrie evidențierea de polimorfonucleate (PMN) și microorganisme (bacterii, micete levuriforme, prezența hifelor).

Raportarea rezultatelor bacteriologice

Rezultat negativ, se raportează:

- nu sunt izolate bacterii relevante din punct de vedere clinic;
- lipsa creșterii microorganismelor din biosubstratul examinat.

Rezultat pozitiv, se raportează:

- microorganisme relevante clinic indicate în Tabelul 6, cu eliberarea antibiogramei.

Timp de raportare

- Raportarea urgentă a rezultatelor se va efectua telefonic/electronic imediat ce acestea sunt disponibile.
- Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat imediat ce este disponibil.

6.6. Otoreea

Rezultat negativ, se raportează:

- nu sunt izolate bacterii relevante din punct de vedere clinic;
- lipsa creșterii microorganismelor din biosubstratul examinat.

Rezultat pozitiv, se raportează:

- microorganisme relevante clinic indicate în Tabelul 7, cu eliberarea antibiogramei.

Timp de raportare

- Raportarea urgentă a rezultatelor se va efectua telefonic/electronic imediat ce acestea sunt disponibile.
- Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat imediat ce este disponibil.

6.7. Secrețiile tractului respirator inferior

Raportarea rezultatelor microscopiei

Se descrie evidențierea și numărul de PMN și CE, cantitatea și tipul de microorganisme.

Raportarea rezultatelor bacteriologice

Rezultat negativ, se raportează:

- nu sunt izolate bacterii relevante din punct de vedere clinic;
- lipsa creșterii microorganismelor din biosubstratul examinat.

Rezultat pozitiv, se raportează:

- microorganisme relevante din punct de vedere clinic* cu indicarea cantitativă a bacteriilor (UFC/ml);
- în cazul în care, potrivit examenului microscopic, prelevatul este inadecvat, în rezultat trebuie menționat: **Prelevat de calitate joasă. Proba provine din tractul respirator superior.**

* Vezi mai jos „Interpretarea rezultatelor”

Timp de raportare

- Raportarea urgentă a rezultatelor se va efectua telefonic/electronic imediat ce acestea sunt disponibile.
- Rezultatul final în formă scrisă va fi eliberat imediat ce este disponibil.

Tabelul 11. Interpretarea numărului de colonii (aplicarea prelevatului cu ansa de 10 μ l)

Nr. de colonii	UFC/ml prelevat	Relevanța		
		PBP	LAB	AET
< 10	10 ²	-	-	-
10 – 99	10 ³	+	-	-
100 – 999	10 ⁴	+	+	-
> 1000	10 ⁵	+	+	+

Tabelul 12. Interpretarea numărului de colonii (diluția de 20 de ori a probei)

Nr. de colonii	UFC/ml prelevat	Relevanța		
		PBP	LAB	AET
3 – 24	10 ³	+	-	+
24 – 249	10 ⁴	+	+	-
\geq 250	\geq 10 ⁵	+	+	+

Interpretarea rezultatelor

1. Se procesează și se raportează indiferent de număr:

- SBH-A
- SBH-B (pentru copii)
- *Bordetella* spp.
- **Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Francisella tularensis**
- *Yersinia pestis**
- *Neisseria gonorrhoeae**
- *Nocardia* spp.
- *Bacillus anthracis**
- *Cryptococcus neoformans*
- micete cu potențial patogen*

* A se consulta cu medicul clinician

2. Se procesează și se raportează dacă izolatul este cantitativ **$\geq 10^4$ UFC/ml** pentru **LBA** și **$\geq 10^5$ UFC/ml** pentru **AET**, chiar dacă acesta nu este predominant în cultură:

- *Moraxella catarrhalis*
- *Neisseria meningitidis*

Pentru pacienții spitalizați:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Acinetobacter* spp.
- *Burkholderia* spp.

3. Se procesează și se raportează dacă izolatul este cantitativ **$\geq 10^4$ UFC/ml** pentru **LBA** și **$\geq 10^5$ UFC/ml** pentru **AET** numai dacă acesta este predominant în cultură:

- bacterii Gram negative (în special *Klebsiella pneumoniae*)
- *Corynebacterium* spp. (pacienți din terapie intensivă)
- *Rhodococcus equi* (imunocompromiși)
- SBH-B (adulti), C, G

4. De asemenea, se procesează și se raportează dacă izolatul este cantitativ **$< 10^4$ UFC/ml** pentru **LBA** și **$< 10^5$ UFC/ml** pentru **AET**:

- microorganisme multirezistente (MRSA, ESBL, CPE, ș.a.)- pentru controlul infecțiilor asociate asistenței medicale.
5. În cazul în care cultura nu se încadrează în criteriile de mai sus și sunt prezente mai multe tipuri de bacterii Gram negative/Gram pozitive, în rezultat se menționează: **„Cultură mixtă de bacterii Gram negative/Gram pozitive”**.
 6. Dacă au fost puși în evidență *Streptococcus* grup *Viridans*, neiserii nepatogene, stafilococi coagulazo-negativi, *Haemophilus* spp. (cu excepția *H. influenzae*), enterococi și levuri*, în rezultat se raportează: **„Microbiotă mixtă a tractului respirator superior”**.

*Prezența de *Candida* spp. poate fi indicată și relevantă la pacienții imunocompromiși, cu adăugarea unei note la rezultat: „*Candida* spp. izolată face parte din microbiota cavității orale și provoacă pneumonie numai în cazuri excepționale”.

CAUZELE INFECȚIILOR TRACTULUI RESPIRATOR

Loc	Agenti infecțioși
Nazofaringe	HRV, Cov, EV, RSV, PIV, Influenza virus A&B
Orofaringe	GAS, <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , EBV, AdV, HRV, CoV, EV, RSV, PIV, Infl A, B, hMPV, HSV, CMV
Urechea medie și sinusurile paranazale	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. catarrhalis</i> , GAS, HRV, CoV, EV
Ochi	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Moraxella</i> spp., AdV
Epiglotă	<i>H. influenzae</i>
Laringe, trahee	<i>S. aureus</i> , AdV, HRV, CoV, EV, RSV, PIV, Infl A, B, hMPV
Bronhii	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , Adv, HRV, CoV, EV, RSV, PIV, Infl A, B, hMPV, Virusul rujeolic
Bronhiole	Adv, HRV, CoV, EV, RSV, PIV, Infl A, B, hMPV
Plămâni (alveole)	Bacterii (Gram negative, Gram pozitive), virusuri, micobacterii, fungi, paraziți.

EV - enterovirus, HRV - human rhinovirus, PIV - parainfluenza virus, Infl A - influenza virus, CoV - coronavirus, AdV - adenovirus, RSV - respiratory syncytial virus, EBV - Epstein Barr virus, hMPV - human metapneumovirus, HSV - Herpes simplex virus, CMV - cytomegalovirus, GAS - grup A *Streptococcus*.

Tehnica recolectării probelor de spută de la copii prin aspirare nazofaringiană

Aspirarea poate determina stimularea directă a fibrelor nervoase vagale, în special la un sugar.

Consilierea familiei

- Se va oferi consiliere individualizată familiei și copilului, adecvată dezvoltării.
- Se va explica copilului și familiei scopul evitării utilizării apei de gură și a pastei de dinți înainte de efectuarea procedurii.
- Instruirea copilului și familiei în scopul evitării contaminării exteriorului colectorului pentru spută pentru a reduce riscul de răspândire a infecției.

Utilizați echipament de protecție individuală adecvat, în funcție de semnele și simptomele pacientului și de indicațiile pentru măsurile de izolare.

Materiale necesare:

1. respirator N95 pentru lucrătorul medical și asistentul său;
2. mănuși de unică folosință;
3. ochelari de protecție, dacă sunt disponibili;
4. tub nazofaringian (se conectează la colectorul de mucus);
5. aspirator electric (se conectează la colectorul de mucus);
6. recipient steril pentru colectarea sputei cu mediu de transport, etichetat cu informațiile despre pacient;
7. pulsoximetru;
8. completați formularul-cerere de laborator cu informațiile despre pacient.

Pregătiri:

1. Informarea familiei și copilului despre necesitatea efectuării procedurii și în ce constă aceasta pentru a minimiza starea de anxietate a acestora.
2. Verificarea identității copilului, utilizând cel puțin doi indicatori.
3. Precizarea când copilul a mâncat ultima dată (copilul nu trebuie să mănânce timp de aproximativ 4-6 ore înainte de procedură).
4. Procedura va fi efectuată într-o încăpere bine ventilată.
5. Completarea formularelor de solicitare de laborator.

6. Pregătirea unui colector suplimentar pentru spută pentru a colecta proba în cazul în care copilul va prezenta tuse în timpul procedurii.
7. Pregătirea unui cateter de aspirație în caz de vărsături în timpul procedurii.
8. La necesitate se va solicita îngrijitorului/asistentului să țină copilul.
9. Așezarea copilului în poziție verticală sau semiverticală; sugarii se țin în decubit dorsal în poziția de hrănire.
10. Se apreciază tipul de respirație al copilului, inclusiv frecvența, profunzimea și paternul acesteea, precum și culoarea mucoaselor și tegumentelor.

Tehnica efectuării:

1. Se spală mâinile cu apă și săpun, apoi se îmbracă echipamentul de protecție.
2. Se pregătește aspiratorul electric și se verifică dacă mecanismul de sucțiune funcționează la propriu.
 - a. se setează vacuum-reglatorul între 60 și 100 mmHg (15-20 kPa) (presiune recomandată pentru copii și nou-născuți).

Presiunea recomandată pentru sucțiune în funcție de vârstă

Vârsta copilului	Presiunea recomandată pentru sucțiune
Nou-născut	60-80 mmHg
Copii până la 5 ani	80-100 mmHg
Copii mai mari de 5 ani	100-120 mmHg
Adulți	100-150 mmHg

3. Se conectează tubul de sucțiune al aspiratorului la adaptorul colectorului de spută.
4. Se verifică dacă dimensiunile cateterului de sucțiune (cateterul nazofaringian) corespund vârstei copilului, se iau măsurările necesare, măsurând distanța până la nazofaringe, plasând capătul tubului la nivelul tragusului urechii și extinzându-l până la vârful nasului, se marchează lungimea pe tub.
5. Se montează cateterul de sucțiune la adaptorul recipientului pentru colectarea sputei.
6. Se aplică o cantitate mică de lubrefiant steril la capătul cateterului de sucțiune (dacă aspirația se va realiza prin nazofaringe).

7. Se explică copilului să respire obișnuit pe parcursul procedurii pentru a preveni hiperventilarea. Se explică copilului că poate să tușească pe parcursul procedurii.
8. E necesar ca persoana care asistă la procedură să dețină controlul asupra capului și mâinilor copilului.
9. Se explică copilului cum să tușească înainte de inițierea procedurii, dacă acesta este dezvoltat corespunzător și înțelege cele explicate (tusea înainte de inițierea procedurii va determina acumularea secrețiilor, facilitând astfel procesul de colectare a sputei).
10. Foarte atent și ușor se introduce capătul cateterului de sucțiune prin una dintre nări spre nazofaringe, prin tubul endotraheal sau traheostomă, fără să porniți mecanismul de sucțiune (introducerea cateterului fără aplicarea sucțiunii micșorează riscul de traumă a mucoasei). Se înaintează cateterul doar până la punctul de rezistență în nară.
11. Se înaintează cateterul ușor și rapid spre trahee. Trecerea prin laringe și trahee va declanșa reflexul de tuse.
12. Se aplică mecanismul de sucțiune apăsând butonul aspiratorului cu degetul mâinii nondominante, timp de 5-10 secunde, în timp ce copilul tușește. Timpul limită pentru sucțiune este de 5 secunde pentru sugari și până la 10 secunde pentru copii.
13. După cel mult 10 secunde, se oprește mecanismul de sucțiune (dacă este aplicată sucțiunea în timpul extragerii se poate deteriora mucoasa) și prin mișcări de rotație se extrage rapid cateterul (mișcările de rotație minimizează traumatismul mucoasei).
 - a. durata fiecărei proceduri de aspirație (sucțiune) nu trebuie să depășească 10 secunde, iar numărul maxim de încercări nu trebuie să depășească cifra 3, cu scopul de a minimaliza hipoxemia, traumatismele mucoasei căilor respiratorii și aritmiile cardiace;
 - b. dacă este nevoie de o altă sucțiune, se lasă copilul pentru cel puțin 30-60 secunde să își revină, apoi procedura se repetă;
 - c. dacă copilul devine hipoxic în timpul procedurii, procedura se stopează imediat și se administrează copilului oxigen;
 - d. e necesar de a menține sterilitatea când se aspiră din tubul endotraheal sau din tubul de traheostomă.
14. Imediat după finalizarea procedurii se evaluează starea copilului. De remarcat orice semne de respirație dificilă sau hipoxemie.
15. Se demontează cateterul de aspirație de la colectorul de spută și se aruncă în recipientul corespunzător.

16. Se demontează tubul de aspirație al aspiratorului de la adaptorul din plastic al colectorului de spută.
17. Se prelucurează suprafața externă a colectorului de spută cu soluție dezinfectantă aprobată.
18. Oferiți copilului să bea, dacă este necesar.
19. Se etichetează proba la patul copilului în prezența părinților/îngrijitorului, conform standardelor în vigoare.
 - a. pentru a evita contaminarea probei recoltate, se închide etanș vasul, apoi se dezinfectează suprafața externă a acestuia;
 - b. proba colectată și etichetată se plasează într-o pungă marcată cu „risc biologic”.
20. Se realizează transportarea imediată a probei în laborator.
21. Se aruncă consumabilele în recipiente speciale, se îndepărtează echipamentul de protecție și se realizează igiena mâinilor.
22. Procedura se documentează în fișa de observație a copilului.

Procedura se stopează imediat, în caz că:

1. apar semne de detresă respiratorie;
2. apare transpirație abundentă, greață/vomă, amețeli sau pierdere de cunoștință.

După efectuarea procedurii de aspirare nazofaringiană:

- ✓ **Se monitorizează starea copilului** pentru cel puțin 10-15 minute. Dacă saturația cu oxigen scade sau apar semne de detresă respiratorie – se administrează copilului oxigen și se aspiră din căile respiratorii secrețiile de mucus în exces.
- ✓ Se explică însoțitorului (părintele) că tusea poate fi mai frecventă în următoarele 24 de ore după efectuarea procedurii.
- ✓ Se observă în continuare caracterul sputei, inclusiv culoarea, consistența, mirosul, viscozitatea și volumul. Se identifică prezența sau absența urmelor de sânge. Caracteristicile anormale ale sputei pot indica anumite entități patologice.
- ✓ Se raportează medicului caracteristicile neobișnuite ale sputei sau modificările acesteia.
- ✓ Se realizează evaluarea, tratarea și reevaluarea durerii.
- ✓ Se verifică dacă toate probele au fost etichetate corect și dacă că formularele de laborator sunt completate suficient.
- ✓ Probele NU se expun la acțiunea razelor solare directe.

Tehnica efectuării procedurii de aspirare nazofaringiană exemplificată prin imagini



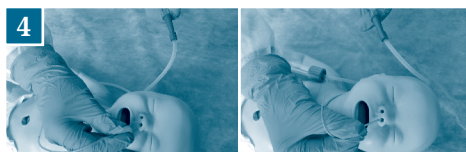
Se roagă pacientul să strănute (dacă e posibil), se îmbracă echipamentul de protecție și se curăță nasul cu soluție fiziologică.



Se conectează colectorul de spută la aspiratorul electric, se montează cateterul de sucțiune la adaptorul recipientului pentru colectarea sputei (după ce se iau măsurile vezi pasul 3).



Se măsoară distanța până la nazofaringe plasând capătul tubului la nivelul tragusului urechii și extinzându-l până la vârful nasului. Se marchează lungimea pe tub.



Se introduce tubul prin nări în nazofaringe. Dacă pacientul nu are dinți, se introduce tubul în orofaringe prin cavitatea bucală.



Dacă pacientul tușește în timpul introducerii tubului și elimină spută de bună calitate, se recoltează în recipientul steril pregătit. Dacă a expectorat ≥ 2 ml de spută, colectarea sputei este completă.



Dacă copilul nu expectorează spută, se introduce tubul în nazofaringe până la lungimea marcată. Atenție să nu se provoace traume nejustificate.



Se pornește aspiratorul electric la o presiune de 15-20 kPa (60 și 100 mmHg) și se crește la necesitate.

Se aspiră pentru a colecta secrețiile respiratorii când se extrage ușor tubul. Se aspiră până când **cel puțin 2 ml de spută** sunt colectate în colector.



Se închide etanș recipientul și se etichetează corespunzător.

Contraindicații

Aspirarea nazofaringiană este contraindicată copiilor cu:

- ✓ Astm bronșic (faza activă);
- ✓ Wheezing;
- ✓ Semne vitale anormale;
- ✓ Orice semne de detresă respiratorie moderată sau severă;
- ✓ Epistaxis;
- ✓ Pneumotorace;
- ✓ Intervenții chirurgicale recente la ochi;
- ✓ Intervenții chirurgicale abdominale recente;
- ✓ Fracturi de coaste sau traumatisme toracice;

Rezultate neașteptate:

- ✓ Copilul devine hipoxic, crește frecvența și efortul respirator sau respirația devine superficială.
- ✓ Scade nivelul de saturație în oxigen al sângelui periferic și nu se restabilește după finalizarea procedurii.
- ✓ După realizarea aspiratului nazofaringian, copilul dezvoltă aritmie.
- ✓ Copilul poate să rămână anxios sau să prezinte disconfort după finalizarea procedurii de aspirație.
- ✓ Specimenul de spută poate să conțină salivă.
- ✓ Eșantionul colectat conține sânge, microorganisme patogene sau celule anormale.
- ✓ Se colectează o cantitate anormală de spută.
- ✓ Mucoasa nazofaringelui este deteriorată sau edemațiată.

Variabile utilizate pentru a distinge pneumonia virală de cea bacteriană

	Sugestii de cauze virale	Sugestii de cauze bacteriene
Vârsta	Mai mică de 5 ani	Adulți
Situație epidemiologică	Epidemie virală	-
Istoria bolii	Debut lent	Debut rapid
Profil clinic	Rinită, respirație șuierătoare	Febră înaltă, tahipnee
Biomarkeri Număr total de celule albe Proteina C-reactivă în ser Procalcitonina în ser	<10x10 ⁹ celule per l <20 mg/l <0-1 μg/l	>15x10 ⁹ celule per l >60 mg/l >0-5 μg/l
Radiografia cutiei toracice	Infiltrat interstițial unic, bilateral	Infiltrate lobare alveolare
Răspuns la tratament cu antibiotic	Lent sau niciun răspuns	Rapid

Particularități specifice ale microorganismelor frecvent implicate în ITR

Specia	Caracteristici generale
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Lancefield grup A)	<i>Streptococcus pyogenes</i> – cocci Gram pozitivi, ovalari, dispuși în lanțuri, uneori izolat. Hemoliza se observă cel mai bine prin incubarea culturii în condiții anaerobe, deoarece hemolizinele sunt mai stabile în absența oxigenului. Streptococii grupului A nu se dezvoltă pe medii ce conțin bilă. Sensibilitatea la bacitracină a fost utilizată prezumtiv în scopuri de screening, însă în baza studiilor recente s-a constatat că acest test prezintă o specificitate redusă.
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Lancefield grup B)	<i>Streptococcus agalactiae</i> – cocci Gram pozitivi, frecvent dispuși în lanțuri scurte, uneori în perechi. Coloniile tind să fie puțin mai mari decât la alți streptococi (aproximativ 1 mm) și au o zonă mai puțin evidențiată de β -hemoliză. Unele tulpini pot fi nehemolitice. Streptococii grupului B se dezvoltă pe medii care conțin bilă. <i>S. agalactiae</i> este un agent patogen important care cauzează boli invazive la nou-născuți și adulți imunocompromiși.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> (grup C) <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>zooepidemicus</i> (Lancefield grup C) <i>Streptococcus canis</i> (Lancefield grup G)	Streptococii grup C și G – cocci Gram pozitivi, aranjați în lanțuri. Aceste grupuri de streptococi produc colonii mai mari ($\geq 0,5$ mm), similare cu streptococii grup A. Streptococii grupele C și G nu se dezvoltă pe medii care conțin bilă. La utilizarea testelor de aglutinare, <i>S. anginosus</i> poate prezenta reacții încrucișate cu anticorpii grupelor C și G. <i>S. anginosus</i> poate crește pe medii care conțin bilă.
<i>Streptococcus anginosus</i> grup (anterior „ <i>Streptococcus milleri</i> ” grup): <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> subspecies <i>whileyi</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> subspecies <i>constellatus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> subspecies <i>pharyngis</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> subspecies <i>viborgensis</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> grup, microscopic sunt cocci Gram pozitivi, aranjați în lanțuri. Coloniile de pe agar sânge sunt mici ($\leq 0,5$ mm) și pot prezenta α , β sau lipsa hemolizei după 16-24 de ore la 35-37°C. Condițiile de incubare pot prezenta o anumită valoare pentru identificarea prezumtivă a grupului <i>S. anginosus</i> , creșterea acestora fiind favorizată de o concentrație mărită de CO ₂ . Microorganismele din acest grup pot conține antigenul grupelor A, C, F sau G ori pot fi negrupabile. <i>S. intermedius</i> nu posedă antigen de grup și la utilizarea testelor de aglutinare rezultatul va fi fals-negativ. <i>S. constellatus</i> poate exprima antigeni din grupul C sau F și <i>S. anginosus</i> poate exprima antigeni din grupele A, C, F sau G. Streptococii din acest grup vor crește pe medii care conțin bilă. Rezistența la sulfonamide și bacitracină poate fi utilizată ca teste de screening pentru microorganismele din grupul <i>S. anginosus</i> . Identificarea unei specii a acestui grup dintr-un prelevat este semnificativă din punct de vedere clinic, datorită posibilității acestui grup de a cauza infecții patologice invazive.
Lancefield grupele A, C, F sau G	

Specia	Caracteristici generale
<p><i>Enterococcus species,</i> <i>Streptococcus bovis</i> grup Lancefield grup D</p>	<p>Streptococii grupului D se dezvoltă pe medii care conțin bilă și pot fi diferențiați de alți streptococi prin hidroliza rapidă a esculinei în prezența a 40% de bilă. Enterococii sunt facultativi anaerobi.</p> <p>Două specii: <i>E. casseliflavus</i> și <i>E. gallinarum</i>, sunt mobile. Enterococii sunt ozidazo-negativi și fermentează carbohidrații. Majoritatea speciilor sunt catalazo negative, dar unele tulpini produc o pseudocatalază.</p> <p><i>E. faecalis</i> este foarte rar rezistent la ampicilină.</p> <p>În ultimul timp, enterococii, care de obicei, prezentau sensibilitate la vancomicină sau glicopeptide (V/GRE), atestă o tendință de creștere a rezistenței către aceste preparate.</p> <p>În prezent, există opt fenotipuri cunoscute de rezistență la vancomicină: vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL și vanM.</p> <p>Grupul <i>S. bovis</i> cuprinde șase specii: <i>S. bovis</i>, <i>S. equinus</i>, <i>S. gallolyticus</i> (anterior <i>S. bovis</i> biotip I), <i>S. infantarius</i> (anterior <i>S. bovis</i> biotip II/1), <i>S. pasteurianus</i> (anterior biotip II/2 <i>S. bovis</i>) și <i>S. lutetiensis</i>.</p>
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> Non-Lancefield grup</p>	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> sunt coci lanceolați, dispuși în perechi, pot fi capsulați. Coloniile sunt de 1-2 mm, α-hemolitice.</p> <p><i>S. pneumoniae</i> este, de obicei, sensibil la optochină, ceea ce permite identificarea rapidă a microorganismului, în același timp, au fost înregistrate cazuri de tulpini rezistente. O zonă de inhibiție clară ≥ 14 mm din jurul discului indică faptul că microorganismul testat este <i>S. pneumoniae</i>.</p> <p><i>S. pneumoniae</i> este solubil în bilă.</p>
<p><i>Haemophilus influenzae</i></p>	<p>Sunt bacterii mici Gram negative, imobile, facultativ anaerobe. Pe agar ciocolată, coloniile sunt mici, gri, rotunde și convexe. Nu cresc pe agar MacConkey sau CLED. De asemenea, necesită factori X și V pentru creștere. Majoritatea tulpinilor de <i>Haemophilus</i> spp. nu cresc pe agar sânge (5% sânge de berbec), deoarece conține doar hemin (factor X), dar lipsește NAD (factorul V).</p> <p><i>S. aureus</i> produce NAD ca produs secundar metabolic atunci când crește într-un mediu de cultură ce conține sânge. Prin urmare, <i>Haemophilus</i> spp. poate crește pe agar cu sânge de berbec în zona de hemoliză a coloniilor de <i>S. aureus</i> (deoarece acesta produce NAD), fenomen cunoscut sub numele de satelitism.</p> <p><i>Haemophilus</i> spp. sunt pozitive pentru oxidază, catalază, fosfatază și reducerea nitraților.</p>

Specia	Caracteristici generale
<i>Moraxella</i> spp.	<p>Speciile <i>Moraxella</i> sunt bacili sau cocci Gram negativi, adesea Gram variabili. Bacilii sunt frecvent foarte scurți și groși, apropiindu-se de forma de coc (cocobacili). Celulele se aranjează, de obicei, în perechi sau lanțuri scurte, morfologic dificil de distins de <i>Neisseria</i>. Temperatura optimă de creștere este de 33-35°C. Speciile <i>Moraxella</i> sunt de obicei catalazo- și oxidazo-pozitive și nu produc acid din carbohidrați.</p> <p><i>M. catarrhalis</i> (anterior <i>Branhamella catarrhalis</i>) crește bine pe agar sânge, precum și pe agar ciocolată, mai puțin pe agar MacConkey. Pe agar sânge coloniile sunt nehemolitice, de culoare gri până la alb, opace, netede, uscate și cu diametrul de 1-3 mm după 24 de ore de incubare. Colonii maronii-roz, asemănătoare coloniilor <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, pe agar ciocolată. Întrucât <i>Neisseria</i> spp. au o temperatură optimă de creștere de 35-37°C, tulpinile <i>M. catarrhalis</i> tolerează temperaturi mai scăzute și cresc bine la 28°C, criteriu diferențial. Coloniile rămân intacte atunci când sunt împinse pe suprafața agarului și sunt nepigmentate.</p>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<p>Diplococi sub formă de „boabe de cafea”, Gram negativi. Aerobi, oxidazo-pozitivi, ce utilizează glucoza și maltoza cu producere de acid. Nu produc hemoliză și nu reduc nitrații. <i>N. meningitidis</i> precum și <i>N. gonorrhoeae</i> formează colonii mari/gri, uniforme, rotunde, umede, lucioase și margini regulate. Nu produc pigment gălbui. În timp, datorită autolizei, coloniile pot deveni cauciucate la atingere.</p>
<i>Corynebacterium</i> spp.	<p>Bacili Gram pozitivi, dreپți sau ușor încurbați, cu capete măciucate sau elipsoizi cu extremitățile ascuțite sau rotunjite, grupate caracteristic sub formă de „V”, „palisade” sau „litere chinezești”. Fixează colorantul neregulat și pot avea incluziuni de polimetafosfat, care se colorează metacromatic cu albastru de metilen policrom (în roșu). Nu sunt acido-rezistenți, nesporulați, aerobi sau facultativ anaerobi, imobili și prezintă un metabolism fermentativ (carbohidrați în acid lactic) în anumite condiții. Microorganismele pretențioase, cresc lent chiar și pe medii îmbogățite. Agarul sânge cu telurit de potasiu, cum ar fi Hoyle telurit, servește ca mediu selectiv și diferențial.</p> <p>Pe mediile cu telurit morfologia coloniilor tipice de <i>C. diphtheriae</i> este mai bine conturată după 48 de ore de incubare la 37°C.</p> <p><i>C. diphtheriae gravis</i> formează colonii plate cu diametrul de 1-2 mm, margini crenelate, striatii radiale și suprafața granulară, consistență friabilă sau semifriabilă, greu emulsionabile. Coloniile sunt negre, cenușii sau negre cu marginea transparentă. Uneori coloniile au aspectul florii de margaretă.</p>

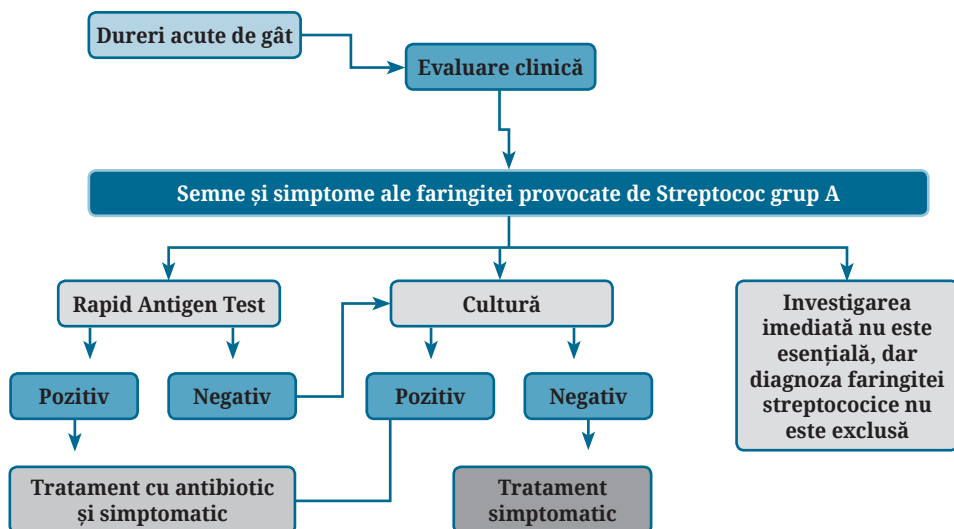
Specia	Caracteristici generale
	<p><i>C. diphtheriae intermedius</i> formează colonii de mărime variabilă, mijlocii sau mici, cu diametrul de 0,5-0,75 mm, aspect plat și centrul ușor mamelonat; marginile sunt circulare, cu suprafața granulară sau lucioasă. Coloniile sunt negre, iar marginea lor este mai transparentă.</p> <p><i>C. diphtheriae mitis</i> formează colonii de mărime variabilă cu diametrul de 1-2 mm, convexe, cu margine circulară, suprafața lucioasă și consistența cremoasă. Cu timpul coloniile devin mai plate și suprafața granulară. Izolatele speciilor potențial toxice de <i>Corynebacterium</i> vor crește, de asemenea, pe agar sânge. Morfologia coloniilor variază în funcție de specie. Coloniile <i>C. ulcerans</i> și <i>C. pseudotuberculosis</i> pot fi ușor β-hemolitice. <i>C. diphtheriae</i>, <i>C. ulcerans</i> și <i>C. pseudotuberculosis</i> sunt facultativ anaerobe, nesporulate, necapsulate și nu sunt acido-rezistente, imobile și catalazo pozitive. <i>C. ulcerans</i> și <i>C. pseudotuberculosis</i> sunt ambele ureazo pozitive, fiind utilizat acest test pentru a le distinge prezumtiv de <i>C. diphtheriae</i>.</p>
<i>Bordetella</i> spp.	<p>Cocobacili Gram negativi, subțiri, dispuși solitari sau în perechi, rareori în lanțuri. Unele tulpini pot fi capsulate. Se cultivă pe agar selectiv cu cărbune, incubat aerob, în condiții de umiditate ridicată și o bună circulație a aerului, timp de 7 zile la 35-37°C. Cu toate acestea, studiile denotă că extinderea incubării până la 12 zile a arătat o recuperare mai bună a speciilor de <i>Bordetella</i>. <i>B. parapertussis</i> este oxidazo-negativă, pe când <i>B. pertussis</i> – oxidazo-pozitivă.</p> <p>Metoda bacteriologică are o specificitate înaltă, fiind deosebit de utilă pentru confirmarea diagnosticului de pertussis atunci când sunt suspecti dintr-un focar. Mai mult, obținerea izolatelor din cultură permite identificarea tulpinilor și testarea sensibilității la antimicrobiene. Preferabilă este obținerea culturii din prelevate nazofaringiene colectate în primele 2 săptămâni de tuse, când bacteriile viabile sunt încă prezente în nazofaringe. După primele 2 săptămâni, sensibilitatea metodei scade și crește riscul obținerii rezultatelor fals-negative.</p> <p>Metode moleculare: PCR, PCR multiplex sunt teste rapide cu sensibilitate înaltă. Cu toate acestea, testele PCR variază în funcție de specificitate. Rezultatele se interpretează în concordanță cu simptomele clinice și informațiile epidemiologice. Tehnica PCR este recomandată în testarea probelor din nazofaringe, recoltate de la 0 până la 3 săptămâni după debutul tusei și, de asemenea, poate oferi rezultate exacte până la 4 săptămâni. După a 4-a săptămână de tuse, cantitatea de ADN bacterian din nazofaringe scade brusc, ceea ce crește riscul de a obține rezultate fals-negative.</p> <p>Serologia: este extrem de utilă pentru confirmarea diagnosticului, în special în timpul unor focare suspecte, momentul optim pentru recoltarea prelevatelor fiind de la 2 până la 8 săptămâni după debutul tusei, când titrul de anticorpi este la cel mai mare nivel.</p>

Specia	Caracteristici generale
<i>Legionella</i> spp.	<p>Familia <i>Legionellaceae</i> cuprinde în prezent 52 de specii și peste 70 de serogrupuri. Aproape o jumătate din speciile <i>Legionella</i> sunt implicate în patologia umană. Mai mult de 90% din izolatele asociate cu boala legionarilor sunt <i>Legionella pneumophila</i>, cu 84% din <i>L. pneumophila</i> serogrup 1 (sg1). Există 3 subspecii și 16 serogrupuri de <i>L. pneumophila</i>, dar serogrupul 1 este cel mai frecvent izolat din biosubstratele umane.</p> <p>Reprezentanții familiei <i>Legionellaceae</i> sunt bacili Gram negativi, pleomorfi. De obicei, în micropreparatele efectuate direct din prelevate (țesut/secreții) sunt vizualizați sub formă de coccobacili, iar cei din coloniile izolate au formă filamentoasă. Sunt aerobe, pretențioase nutritiv și nu cresc pe agar sânge. Metode de detecție și performanța lor:</p> <p>Cea mai utilizată metodă este detecția antigenului într-o probă de urină, în timpul fazei acute a bolii. Testul detectează în special tulpinile de <i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1.</p> <p>Totuși, gold standard-ul rămâne cultura din proba respiratorie, datorită rolului pe care îl poate avea în identificarea sursei, prin compararea tulpinilor din probele biologice și de mediu și datorită abilității acesteia de a detecta tulpini mai puțin comune.</p> <p>Din acest motiv, este ferm recomandată colectarea de spută sau a unei probe de lavaj bronho-alveolar de la pacienți cu pneumonie, în scopul identificării bacteriei din cultura izolată.</p> <p>Metoda bacteriologică: medii speciale – sensibilitate 20-80%, specificitate – 100%, tehnică laborioasă, crește lent (>5 zile), influențată de antibioterapie.</p> <p>Metoda serologică: sensibilitate 80-90%, specificitate >99%, examinarea serurilor perechi. Laboratoarele internaționale nu efectuează teste serologice din cauza inconvenientelor în obținerea specimenelor adecvate. Prin această metodă rezultatele sunt raportate tardiv și, prin urmare, nu sunt utile pentru diagnosticarea cazurilor acute sau în investigarea focarelor active.</p> <p>DFA (Direct Fluorescent Antibody): sensibilitate 25-75%, specificitate ≥95%, tehnică dificilă și deficiențe în achiziționarea reagenților.</p> <p>Antigen urinar pentru <i>L. pneumophila</i> serogrup (Lp1): sensibilitate 70-100%, specificitate 95-100%, sunt înregistrate reacții încrucișate.</p> <p>PCR: lipsește aprobarea FDA, sensibilitate 95-99%, specificitate >99%. PCR multiplex rapid, cu aprobarea FDA.</p> <p>Notă: Antigenul urinar se recomandă a fi utilizat în combinație cu metoda bacteriologică.</p>

Specia	Caracteristici generale
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<p><i>Chlamydia pneumoniae</i>, bacterie intracelulară obligatorie, Gram negativă (0,2 până la 1 μm) care suportă mai multe transformări în ciclul său de viață.</p> <p>Pentru diagnostic pot fi utilizate mai multe metode: culturală (în laboratoare specializate/de referință), serologică sau metode moleculare. PCR rămâne a fi metoda preferabilă de testare pentru diagnosticul infecției acute cu <i>C. pneumoniae</i>.</p> <p>Cultivarea în culturi de celule este rareori utilizată.</p> <p>Serologie (faza acută și convalescență), seroprevalență 40-70%, dificil de interpretat.</p> <p>Metode moleculare (PCR, PCR multiplex rapide – aprobate FDA): sensibilitate și specificitate înaltă, rezultate rapide.</p>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<p><i>Mycoplasma</i> spp. sunt microorganisme de dimensiuni mici, lipsite de perete celular, polimorfe. Sunt cunoscute peste 120 de specii și doar 13 dintre ele au importanță în patologia umană, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> fiind agentul patogen cel mai frecvent înregistrat. Exigent nutritiv, necesită medii de cultură speciale și crește lent. Din aceste motive, nu este cultivat de rutină.</p> <p>Laboratoarele clinice pot oferi teste diagnostice pentru infecțiile cu <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, utilizând metoda bacteriologică, serologică sau PCR.</p> <p>Metoda bacteriologică este realizată doar în laboratoare de referință.</p> <p>Metoda serologică se utilizează în perioada acută a bolii și convalescență.</p> <p>Metode moleculare (PCR, PCR multiplex rapide aprobate FDA): sensibilitate și specificitate înaltă, rezultat rapid.</p>
<i>Aspergillus</i> spp.	<p>Societatea Europeană pentru Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase, Confederația Europeană de Micologie Medicală precum și Ghidurile Clinice Comune ale Societății Respiratorii Europene se concentrează pe diagnosticul și managementul aspergilozei umane și recomandă un algoritm complex de diagnostic al acestei patologii.</p> <p>Tomografia computerizată toracică, precum și bronhoscopia cu recoltarea lavajului bronhoalveolar (LBA) sunt obligator indicate la pacienții cu suspjecție de aspergiloză invazivă pulmonară.</p> <p>De asemenea, pentru stabilirea diagnosticului, sunt strict recomandate microscopia directă, de preferință optică pe câmp luminos, examenul histopatologic și metoda culturală (medii speciale, de ex. Sabouraud dextrose agar cu gentamicină, plus cloramfenicol la 30°C și 37°C timp de 72 de ore) și de identificare până la nivel de specie prin tehnica MALDI-TOF MS (pentru izolatele relevante clinic de la pacienții care au nevoie de tratament și în scop epidemiologic).</p>

Specia	Caracteristici generale
	<p>Testul de determinare a antigenului <i>Aspergillus</i> (galactomannan) se face din ser și LBA și este recomandat ca marker pentru diagnosticul aspergilozei invazive. Detectarea galactomannanului (în special din LBA) este mai sensibilă decât metoda culturală.</p> <p>Pentru antigenul <i>Aspergillus</i> este raportată o rată de rezultate fals-pozitive de 7-14%. Unele produse alimentare conțin galactomannan și modificările peretului intestinal induse de chimioterapie, iradiere sau de reacția grefă-contra gazdei facilitează transferul antigenului din lumenul intestinal în sânge, fiind responsabil parțial de rezultatele fals-pozitive obținute la acest test. Antibioticele semisintetice (de ex. piperacilina, amoxicilina, amoxicilina/acid clavulanic) pot da reacții încrucișate cu anticorpii monoclonali incluși în test. Probele care contin antigenul <i>Histoplasma</i> pot da, de asemenea, reacții încrucișate.</p> <p>Un rezultat negativ nu exclude o aspergiloză invazivă. Rezultatele tehnicilor PCR vor fi luate în considerare împreună cu rezultatele altor teste de diagnostic. Identificarea agentului patogen la nivel de specie este strict recomandată pentru toate izolatele de <i>Aspergillus</i> spp. relevante clinic.</p> <p>Testarea sensibilității antimicotice se efectuează la pacienții cu infecții invazive.</p> <p>Isavuconazolul și voriconazolul sunt preparatele antifungice indicate pentru tratamentul de primă linie a aspergilozei invazive pulmonare, în timp ce amfotericina B este mai puțin recomandată. Combinații de antifungice ca opțiuni de tratament primar nu sunt indicate.</p> <p>Rezistența speciilor de <i>Aspergillus</i> la antifungice este o problemă în creștere și infecțiile cauzate de aceste tulpini sunt dificil de tratat și soldate cu eșec terapeutic.</p> <p>Rezistența la unele preparate antifungice se poate dezvolta atât la persoanele care primesc o terapie antifungică, cât și la cele care nu au utilizat aceste preparate, sugerând că rezistența unor tulpini este parțial determinată de factorii de mediu. Studiile au demonstrat că tratarea culturilor agricole cu fungicide azolice, similare cu preparatele azolice (de ex. voriconazol), poate conduce la apariția tulpinilor rezistente de <i>Aspergillus</i> în sol și în alte obiecte de mediu.</p>

Managementul faringitei acute



Interpretarea rezultatelor în funcție de prelevat

Proba	Criterii pentru semnificație clinică probabilă	Criterii pentru lipsa unei semnificații clinice	Informație adițională care sugerează semnificația clinică
Spută expectorată sau indusă	Patogen predominant din cultură și frotiu	Patogen predominant ce nu este prezent în frotiu și cultură în cantități: puțin/moderat	Patogen potențial în neutrofile (intracelular)
Cultură cantitativă	$\geq 10^6$ UFC/ml	$< 10^6$ UFC/ml	Absența microflorei indigene
Neutrofile	Abundent	Neabundent	
Aspirat endotraheal	Patogen predominant din cultură și frotiu	Patogen predominant ce nu este prezent în cultură în cantități: puțin/moderat	Patogen potențial în neutrofile (intracelular)
Cultură cantitativă	$\geq 10^5$ UFC/ml	$< 10^5$ UFC/ml	$< 10^6$ UFC/ml, 1-2 patogeni predominanți în cultură și absența florei normale
Neutrofile	Abundent	Neabundent	
Lavaj bronheoalveolar	Patogen predominant evidențiat în fiecare câmp din frotiu (100x)	Absența unui patogen predominant în frotiu	Patogen potențial în neutrofile (intracelular)
Cultură cantitativă	$\geq 10^4$ UFC/ml	$< 10^4$ UFC/ml	$< 10^4$ UFC/ml, 1-2 patogeni predominanți și absența microflorei indigene
Neutrofile	Abundent	Neabundent	

REFERINȚE

1. Abdulhadi B., Kiel J. Mycoplasma Pneumonia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. PMID: 28613531.
2. Arvanitis M., Anagnostou T., Fuchs B.B., Caliendo A.M., Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. In: *Clin Microbiol Rev* 2014;27:490-526.
3. Avni T., Levy I., Sprecher H., Yahav D., Leibovici L., Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Systematic review. In: *J Clin Microbiol* 2012.
4. Baron E.J. Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition, ASM, 2015, Chapter 18.
5. Baselski V.S., Wunderink R.G. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. In: *Clin Microbiol Rev* 1994;7:533-58.
6. Bălan G., Burduniuc O., Spînu C. Aspecte contemporane ale sensibilității la antibiotice a tulpinilor de streptococi β -hemolitici din grupa A izolate din infecțiile tractului respirator. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria "Științe Reale și ale Naturii"* Chișinău, 2015, 1 (81), 34-36. ISSN 1814-3237, ISSN Online 1857-498x.
7. Brauer V.S., Rezende C.P., Pessonni A.M., De Paula R.G., Rangappa K.S., Nayaka S.C. et al. Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health external icon. In: *Biomolecules* 2019;9:521.
8. Buiuc D., Neguț M. *Tratat de microbiologie clinică*. Editura Medicală. București, 2017.
9. Burduniuc O. Factorii de virulență a fungilor patogeni: semnificația clinică și detectarea fenotipică. În: *Studia Universitatis, Seria Științe Reale și ale Naturii*. 2018, 6(116), 3-13. ISSN 1814-3237.
10. Burduniuc O. Fenomenul de rezistență la antibiotice - problemă gravă de sănătate publică. În: *Sănătate Publică Economie și Management în Medicină*. Chișinău, 2012, 1 (40), 57- 60. ISSN 1729-8687.
11. Burduniuc O., Bălan G. Conștientizarea populației privind consumul de antimicrobiene în Republica Moldova. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. Chișinău, 2015, 3(60), 160-163. ISSN 1729-8687.
12. Callaghan M., McClean S. Bacterial host interactions in cystic fibrosis. In: *Curr Opin Microbiol* 2012;15:71-7.
13. Chabe M., Khalife S., Gantois N., Even G., Audebert C. An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp. In: *Med Mycol* 2014.
14. Chabe M., Khalife S., Gantois N., Even G., Audebert C. An improved single-round PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Pneumocystis* spp. In: *Med Mycol* 2014.
15. Connor R., O'Doherty J., O'Regan A., O'Neill A., McMahon C., Dunne C.P. Medical management of acute upper respiratory infections in an urban primary care out-of-hours facility: cross-sectional study of patient presentations and expectations. In: *BMJ Open*. 2019;9(2):e025396. Published 2019 Feb 15. doi:10.1136/bmjopen-2018-025396.
16. Das S., Dunbar S., Tang Y.W. Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children - the State of the Art. In: *Front Microbiol*. 2018;9:2478. Published 2018 Oct 18. doi:10.3389/fmicb.2018.02478.

17. Denning D.W., Kibbler C.C., Barnes R.A. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. In: *Lancet Infect Dis* 2003;3:230-40.
18. Echavarría M., Marccone D.N., Querci M., Seoane A., Ypas M., Videla C., O'Farrell C., Vidaurreta S., Ekstrom J., Carballal G. Clinical Impact of Rapid Molecular Detection of Respiratory Pathogens in Patients With Acute Respiratory Infection. In: *Journal of clinical virology* 2018;108:90-95.
19. Enne V.I., Baldan R., Russell C., Aydin A., Richardson H., Owen D., Nomamiukor B., High J., Colles A., Brealey D., Ricciardi F., Barber J., Swart A.M., O'Grady J., Gant V., Livermore D.M. Appropriateness of Antimicrobial Prescribing for Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia (HAP/VAP) in UK ICUs assessed against PCR-based Molecular Diagnostic Tests. ECCMID 2019.
20. ESCMID-ECMM-ERS guideline. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017. In: *Clinical Microbiology and Infection* 24 (2018), e1-e38.
21. Esther C.R., Lin F.C., Kerr A., Miller M.B., Gilligan P.H. Respiratory viruses are associated with common respiratory pathogens in cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 2014;49:926-31.
22. Fendrick A.M., Monto A.S., Nightengale B., Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. In: *Arch Intern Med* 2003, 163:487-494. doi:10.1001/archinte.163.4.487. [PubMed] [Cross-Ref] [Google Scholar]
23. Fillaux J., Berry A. Real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In: *Methods Mol Biol* 2013;943:159-70.
24. Gilad J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*: the causative micro-organisms of glanders and melioidosis. In: *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2007;2:233-41.
25. Golpe R., Marin B., Alonso M. Lemierre's syndrome (necrobacillosis). In: *Postgrad Med J* 1999;75:141-4.
26. Harris K.A., Kenna D.T. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis: molecular typing and clinical outcomes. In: *J Med Microbiol* 2014;63:1241-6.
27. Hayette M.P., Vaira D., Susin F., Boland P., Christiaens G., Melin P. et al. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. In: *J Clin Microbiol* 2001; 39:2338-40.
28. Hospital-Acquired Pneumonia (Nosocomial Pneumonia) and Ventilator-Associated Pneumonia Updated: Jun 10, 2020, Burke A Cunha. <https://emedicine.medscape.com/article/234753-overview>.
29. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. In: *Eur Respir Rev* 2011;20:156-74.
30. Lee B.R., Hassan F., Jackson M.A., Selvarangan R. Management of Hospitalized Children with Acute Respiratory Tract Infections. In: *Journal of clinical virology* 2019;110:11-16.
31. Lowe C.F., Payne M., Puddicombe D., Mah A., Wong D., Kirkwood A., Hull M.W., Leung V. Antimicrobial stewardship for hospitalized patients with viral respiratory tract infections. In: *Am J Infect Control* 2017, 45:872-875. doi:10.1016/j.ajic.2017.03.025.
32. Meneghetti A. Upper Respiratory Tract Infection Treatment & Management Updated: Jun 21, 2018.
33. Molinari N.A., Ortega-Sanchez I.R., Messonnier M.L., Thompson W.W., Wortley P.M., Weintraub E., Bridges C.B. The annual impact of seasonal influenza in the US:

measuring disease burden and costs. *Vaccine* 2007, 25:5086-5096. doi:10.1016/j.vaccine.2007.03.046.

34. Morris A., Lundgren J.D., Masur H., Walzer P.D., Hanson D.L., Frederick T. et al. Current epidemiology of Pneumocystis pneumonia. In: *Emerg Infect Dis* 2004;10:1713-20.
35. Rand K.H., Beal S.G., Cherabuddi K., Houck H., Lessard K., Tremblay E.E., Rindlisbacher C., Jones J., Sstrom C. Relationship of a Multiplex Molecular Pneumonia Panel (PP) Results with Hospital Outcomes and Clinical Variables. In: *ID WEEK* 2019.
36. Rappo U., Schuetz A.N., Jenkins S.G., Calfee D.P., Walsh T.J., Wells M.T., Hollenberg J.P., Glesby M.J. Impact of early detection of respiratory viruses by multiplex PCR assay on clinical outcomes in adult patients. In: *J Clin Microbiol* 2016.54:2096-2103. doi:10.1128/JCM.00549-16.
37. Rogers B.B., Shankar P., Jerris R.C., Kotzbauer D., Anderson E.J., Watson J.R., O'Brien L.A., Uwindatwa F., McNamara K., Bost J.E. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. In: *Arch Pathol Lab Med* 2015, 139:636-641. doi:10.5858/arpa.2014-0257-OA.
38. Snelders E., Huis V.R., Rijs A.J., Kema G.H.J., Melchers W.J.G., Verweij P.E. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles external icon. In: *Appl Environ Microbiol* 2009;75:4053-7.
39. UK Standards for Microbiology Investigations Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens, Bacteriology, B 57, Issue no: 3.5, Issue date: 08.05.2019. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/800451/B_57i3.5.pdf
40. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Nasal Samples, Bacteriology, B 5 Issue no: 7.1, Issue date: 12.01.15.
41. Vandamme P., Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. In: *Syst Appl Microbiol* 2011;34:87-95.
42. Verweij P.E., Kema G.H., Zwaan B., Melchers W.J. Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus* external icon. In: *Pest Manag Sci* 2013;69:165-70.
43. Webber D.M., Johnson C., Wallace M.A., Burnham C.A.D., Anderson N.W. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for Detection of Viral and Bacterial Pathogens in Lower Respiratory Tract Specimens in the Setting of a Tertiary Care Academic Medical Center. In: *ASM* 2019.
44. Winn C.J., Nygren D., Holm K. Invasive infections with *Fusobacterium necrophorum* including Lemierre's syndrome: an 8-year Swedish nationwide retrospective study. In: *Medical Microbiology* 4th edition, Chapter 40, 2019 DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.002>.

