



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



ANSP
AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂȚATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”
DIN REPUBLICA MOLDOVA

GHID

DIAGNOSTICUL DIFTERIEI ȘI ALTOR INFECȚII ASOCIATE



Chișinău, 2023



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



ANSP
AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”
DIN REPUBLICA MOLDOVA

GHID

DIAGNOSTICUL DIFTERIEI ȘI ALTOR INFECȚII ASOCIATE

Chișinău, 2023

Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova din 29.06.2023, proces-verbal nr. 2

Aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr. 883 din 18.10.2023, cu privire la aprobarea Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate”

Colectivul de autori:

Olga Burduniuc dr. hab. șt. med., conf. univ., Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Greta Bălan dr. hab. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Olga Sofronie cercetător științific, MSP, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Gheorghe Plăcintă dr. hab. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Ludmila Bîrca dr. șt. med., conf. univ., IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii
Ludmila Serbenco dr. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”
Tatiana Juravliov asistent universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”
Laura Țurcan dr. șt. med., medic epidemiolog, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Mariana Apostol medic epidemiolog, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Alina Cataraga medic microbiolog, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Svetlana Colac medic microbiolog, Agenția Națională pentru Sănătate Publică

Recenzenți:

Victoria Bucov dr. hab. șt. med., prof. univ., Agenția Națională pentru Sănătate Publică
Valeriu Rudic dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., USMF „Nicolae Testemițanu”
Victor Pântea dr. hab. șt. med., prof. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

Ghidul a fost examinat, avizat și aprobat de:

Structura/instituția	Prenume, nume, funcția
Consiliul științific al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică	<i>Nicolae Jelamschi</i> , dr. șt. med., master în sănătate publică, președinte
Comisia științifico-metodică de profil „Medicină comunitară” a USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Gheorghe Plăcintă</i> , dr. hab. șt. med., conf. univ., președinte
Catedra de medicină de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Anatolie Vișnevschi</i> , dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Catedra de medicină de familie, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Ghenadie Curocichin</i> , dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Catedra de farmacologie și farmacologie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Nicolae Bacinschi</i> , dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale	<i>Dragoș Guțu</i> , director general
Compania Națională de Asigurări în Medicină	<i>Ion Dodon</i> , director general
Consiliul de Experți al Ministerului Sănătății	<i>Aurel Grosu</i> , dr. hab. șt. med., prof. univ., președinte

Tipar: „Continental-Grup” SRL

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA

Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate: ghid / *Olga Burduniuc, Greta Bălan, Olga Sofronie* [et al.]; Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie «Nicolae Testemițanu» din Republica Moldova. – Chișinău: [S. n.], 2023 (Continental Grup). – 64 p.: tab.

Aut. indicați pe verso f. de tit. – Referințe bibliogr.: 63-64 (20 tit.). – 300 ex.

ISBN 978-9975-82-349-4.



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun. Chișinău

18 octombrie 2023

Nr. 883

Cu privire la aprobarea Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator acordate populației, în temeiul Hotărârii Guvernului nr.148/2021 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate”, conform anexei.
2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale vor organiza implementarea și monitorizarea aplicării în practică a Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate”.
3. Conducătorul Agenției Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea autorizării și înregistrării dispozitivelor medicale, consumabilelor, reagenților și echipamentelor incluse în Ghidul „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate”.
4. Conducătorul Companiei Naționale de Asigurări în Medicină va organiza ghidarea angajaților din subordine de Ghidul „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii încadrați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.
5. Conducătorul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică va organiza evaluarea:
 - 1) aplicării Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale;
 - 2) respectării cerințelor Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” în contextul controlului activității instituțiilor prestatoare de servicii medicale.
6. Direcția managementul calității serviciilor de sănătate, de comun cu Agenția Națională pentru Sănătate Publică, vor asigura suportul consultativ-metodic în implementarea Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” în activitatea prestatorilor de servicii medicale.
7. Rectorul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și conducătorii colegiilor de medicină vor organiza implementarea Ghidului „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” în activitatea didactică a catedrelor respective.
8. Ghidul „Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate” va fi plasat pe pagina oficială a Ministerului Sănătății, la rubrica Legislație/Ghiduri, protocoale, standarde.
9. Controlul executării prezentului ordin se atribuie secretarilor de stat.

Ministru

Ala NEMERENCO

CUPRINS

Abrevieri	6
1. Scop, obiective, utilizatori.....	7
2. Introducere	8
3. Situația epidemiologică la nivel global și în țară	11
4. Fiziopatologia și aspectele clinice	13
5. Proceduri de colectare, păstrare și transportare a probelor clinice	20
5.1. Criterii de screening a specimenelor suspecte la <i>Corynebacterium</i> spp.	20
5.2. Colectarea, depozitarea și transportarea probelor din cazuri suspecte de difterie respiratorie sau cutanată și contacti.....	21
6. Proceduri privind izolarea și biotiparea <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> și <i>C. pseudotuberculosis</i>	23
6.1. Proceduri de laborator pentru izolarea primară a corinebacteriilor potențial toxigene	23
6.2. Cultura primară și izolarea.....	24
6.3. Criterii de recunoaștere a coloniilor suspecte care necesită o evaluare ulterioară.....	24
6.4. Identificarea prezumtivă și screeningul speciilor de <i>Corynebacterium</i> potențial toxigene și netoxigene	25
6.5. Examinarea microscopică și procedurile de colorare pentru colonii/culturi suspecte	26

6.6. Identificarea biochimică	27
6.7. Raportarea datelor de laborator	29
7. Detectarea fenotipică a toxicității: testul Elek	30
7.1. Metodologia de detectare a toxinei difterice: testul Elek	30
8. Sistemele automate de identificare a speciilor de <i>Corynebacterium</i>	33
9. Teste de amplificare a acizilor nucleici pentru confirmare a prezenței toxigenității <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
10. Tipizarea moleculară și secvențierea genelor <i>Corynebacterium</i> spp.....	38
11. Proceduri privind examenul serologic de evaluare a imunității, susceptibilității individuale și populației la difterie	43
12. Principii de testare a sensibilității la antimicrobiene	45
13. Rolul laboratorului microbiologic în prevenirea și controlul infecției cauzate de <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i>	46
14. Aspecte de biosiguranță și biosecuritate	47
Anexe	48
Referințe.....	63

ABREVIERI

ANSP	Agenția Națională pentru Sănătate Publică
CYS	Cistinaza
NTTB	non-toxigenă, purtătoare de genă ce codifică toxina
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
PCR	<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction
PYZ	Pirazinamidaza
SUA	Statele Unite ale Americii

1

Scop, obiective, utilizatori

Scopul ghidului este de a reglementa activitățile de supraveghere și control ale difteriei și altor infecții asociate.

Obiectivele ghidului:

- Descrierea procedurilor microbiologice privind izolarea, identificarea și confirmarea toxicității *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* și *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
- Asistarea specialiștilor de laborator în procedurile corecte de diagnosticare a cazurilor de difterie;
- Ghidarea medicilor clinicieni în opțiunile de tratament.

Ghidul include caracteristicile epidemiologice, microbiologice și clinice ale difteriei. Totodată, include o componentă veterinară care ia în considerare raportările tot mai mari de infecții umane datorate în principal tulpinilor de *C. ulcerans* și ocazional infecțiilor zoonotice cu *C. pseudotuberculosis*. Ghidul abordează procedurile serologice pentru evaluarea imunității și tipizarea moleculară a corinebacteriilor potențial toxigene.

Ghidul, de asemenea, prevede principiile de depistarea precoce (în primele 12-24 de ore ale bolii) a bolnavilor cu difterie, examinarea la difterie (exsudat faringian și nazal) a bolnavilor cu angină, laringită, laringotraheită și alte boli suspecte, examinarea la difterie a persoanelor de contact din focare, spitalizarea provizorie a bolnavilor cu angină, instalarea carantinei în colectivități de copii (7 zile), examinarea clinică și bacteriologică a persoanelor de contact, depistarea printre ei a copiilor neimuni și imunizarea lor urgentă, depistarea în focare a purtătorilor de bacili difterici și bolnavilor cu forme atipice, tratarea și vaccinarea lor conform Protocolului Clinic Național pe difterie.

Utilizatorii ghidului sunt:

- Prestatorii de servicii de AMP (medicii de familie și asistentele medicale de familie);
- Prestatorii de servicii de AMSA (specialiști de laborator, medicii infecționiști, ORL din instituțiile/secțiile consultative);
- Prestatorii de servicii de AMS (secțiile de boli infecțioase, reanimare și de terapie intensivă ale spitalelor raionale/municipale, spitalele de boli contagioase, specialiști de laborator, medici epidemiologi, infecționiști, pediatri-infecționiști, pediatri, ORL).
- Agenția Națională pentru Sănătate Publică.

Notă: Ghidul poate fi utilizat și de alți specialiști, inclusiv în procesul didactic în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor și personalului medical cu studii medii.

Difteria și alte infecții cauzate de corinebacterii potențial toxigene continuă să prezinte un rol major ca boală infecțioasă severă și difteria rămâne a fi o problemă serioasă de sănătate în multe regiuni ale lumii. În plus, diagnosticul de difterie poate fi întârziat în țările cu incidență scăzută sau fără incidență; în consecință, ratele mortalității în țările neendemice (~16%) sunt similare cu nivelurile înregistrate înainte de introducerea imunizării în masă. Astfel, diagnosticul microbiologic corect al bolii, identificarea contactilor, purtătorilor și managementul clinic al pacienților sunt cruciale. Tipul de infecții umane cauzate de corinebacterii potențial toxigene, în special, *C. diphtheriae*, s-a schimbat de-a lungul deceniilor. Acest lucru este confirmat de emergența în multe regiuni ale lumii a unor tulpini netoxigenice de *C. diphtheriae* care cauzează boli atipice și complicații sistemice, cum ar fi endocardita, miocardita, artrita septică și, mai frecvent, episoadele severe și recurente de durere în gât.

Difteria este o boală neobișnuită cauzată de speciile de *Corynebacterium* potențial toxigene, și anume, *C. diphtheriae* și mai rar *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*. Ultimele două specii cauzează zoonoze și sunt descrise mai jos. Toate cele trei microorganisme sunt bacili Gram pozitivi, pleomorfi, aerobi. Printre *C. diphtheriae*, există patru biovaruri principale: *gravis*, *mitis*, *intermedius* și *belfanti*. Recent, studiile taxonomice au arătat că biovarul *belfanti* reprezintă o variantă care este clar delimitată de *C. diphtheriae* biovar *mitis* și *gravis* și pe baza acestor constatări a fost propusă o nouă specie, *Corynebacterium belfantii* sp. nov. Ne vom referi în continuare la aceste tulpini ca biovar *belfanti*.

Corynebacterium diphtheriae

Principalul determinant al virulenței *C. diphtheriae* este toxina difterică, care reprezintă o proteină codificată de bacteriofagi. Complicațiile clinice sunt mai severe atunci când tulpina produce această toxină, provocând obstrucție respiratorie, miocardită și afecțiuni neurologice. Cele trei specii potențial toxice (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*) pot produce, de asemenea, toxină difterică. Detectarea toxinei difterice este cel mai important test pentru diagnosticul microbiologic al difteriei. Acest lucru trebuie făcut fără întârziere pe orice izolat suspect identificat în timpul screeningului de rutină sau în timpul investigării unui posibil caz de difterie. Este esențial să se limiteze orice posibilă răspândire a bolii prin identificarea contactilor care pot fi sau devin purtători. Metodele moderne care utilizează reacția de polimerizare în lanț (PCR) direct din probele clinice accelerează procesul de diagnostic de laborator. Cu toate acestea, orice prelevat pozitiv pentru gena ce codifică toxina trebuie cultivat, iar izolatul – testat pentru producerea de toxină difterică.

Corynebacterium ulcerans

C. ulcerans poate produce toxină difterică care este imunologic similară cu cea produsă de *C. diphtheriae*, deoarece găzduiește un bacteriofag lizogenic purtând gena *tox*. De asemenea, *C. ulcerans* poate produce o exotoxină, fosfolipaza D, sau poate produce ambele toxine simultan.

C. ulcerans este o bacterie cu o distribuție mondială și o gamă largă de gazde. A fost identificat ca o cauză rară a mastitei la bovine, iar laptele crud a fost recunoscut ca o sursă de infecție umană. Infecția ugerului poate dura timp îndelungat, dar excreția în lapte a bacteriilor poate fi intermitentă. Dovezile epidemiologice din investigațiile bolilor umane sugerează că ocazional laptele de capră poate fi contaminat cu această specie. *C. ulcerans* a fost, de asemenea, izolată de la specii de animale sălbatice și domestice atât afectate clinic, cât și sănătoase, inclusiv câini (ulcerații labiale cronice, strănut și rinoree), pisici (secreții nazale cronice), cai (nazofaringe), capre (meningoencefalită piogranulomatoasă), cămilă (limfadenită cazeoasă), vulpe roșie, căprior (abces cazeos), vidre (plămâni), porci și mistreți (abcese cazeoase), veverițe de pământ Richardson (dermatită gangrenoasă), lei (sepsis), balene ucigașe (pneumonie purulentă/bacteremie) și primate non-umane (infecții respiratorii, mastite, plăgi prin mușcătură și abcese cervicale).

Corynebacterium pseudotuberculosis

C. pseudotuberculosis are un înveliș lipidic de suprafață, citotoxic care conține acizi micolici ce mediază rezistența la distrugere de către fagocite și facilitează supraviețuirea intracelulară și formarea abceselor. De asemenea, microorganismul produce fosfolipază, o exotoxină care crește permeabilitatea vasculară, inhibă fagocitele și poate facilita răspândirea infecției în organismul gazdă.

C. pseudotuberculosis a fost clasificat în două biotipuri în funcție de capacitatea lor de a descompune nitrații. Ambele biotipuri produc exotoxină, fosfolipaza D care funcționează ca o sфингомиелинаză și acționează asupra celulei endoteliale vasculare, ceea ce poate explica capacitatea acesteia de a crește permeabilitatea vasculară și de a facilita răspândirea infecției prin sistemul limfatic. *C. pseudotuberculosis* este similară cu *C. diphtheriae* și *C. ulcerans* prin faptul că poate găzdui gena care codifică toxina difterică transmisă de fagi. Cu toate acestea, *C. pseudotuberculosis* produce rar toxină difterică și testele de detecție a toxinei difterice sunt rareori efectuate/raportate în multe țări atunci când acest microorganism este izolat din probele de la animale.

C. pseudotuberculosis determină limfadenită cazeoasă la ovine și caprine (prezentându-se de obicei ca abcese superficiale extrem de evidente care afectează ganglionii limfatici, dar în cazurile cu leziuni interne, infecția poate fi detectabilă doar la necropsie), limfangita ulcerativă la bovine și cai și, de asemenea, abcese externe și interne la cai. Cele mai multe infecții au fost raportate în mediul rural la păstori sau la măcelari care au prezentat fie limfadenită acută, fie cronică.

TRANSMISIA ȘI PORTAJUL

Perioada de incubație pentru difterie este, de obicei, de la două până la cinci zile, uneori mai lungă, iar cel mai comun mod de transmitere este prin picături în timpul contactului cu o persoană infectată.

Calea de transmitere a infecției este aerogenă prin picături cu transmitere a agentului patogen la distanțe mici. Infectarea are loc la contacte apropiate cu sursa de infecție și se realizează indiferent de statutul imun al persoanei contacte. În difteria cutanată, conjunctivală, a organelor genitale infectarea are loc prin contact cu obiectele, mâinile contaminate cu eliminări din focarele patologice difterice.

Sursa de infecție este omul bolnav și cel purtător de bacili difterici toxigeni. Sursele de infecție includ secrețiile din faringe și nas sau ocazional din piele și conjunctivă în cazul difteriei cutanate. Este caracteristică sezonabilitatea de toamnă-iarnă. Studii recente au constatat că igiena precară și supraaglomerarea sunt asociate cu dezvoltarea focarelor de difterie din cauza condițiilor de mediu, de exemplu prin inhalarea prafului care conține corinebacterii. Portajul asimptomatic al corinebacteriilor potențial toxigene (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*) poate apărea în perioada de incubație, în timpul convalescenței sau la indivizii sănătoși. În țările în care difteria este endemică, între 3% și 5% dintre persoanele sănătoase pot fi purtătoare (la nivelul nazofaringelui). Alte manifestări ale bolii, în special difteria cutanată, sunt problematice în țările tropicale, unde leziunile pot servi ca rezervoare pentru transmiterea și răspândirea difteriei faringiene. Unii călători, care se întorc cu infecții de plagă din țările endemice pentru difterie, au fost diagnosticați cu difterie cutanată produsă de tulpini toxigene.

Au fost descrise numeroase cazuri de transmitere între oameni și animalele de companie, care pot fi surse potențiale de infecție. Transmiterea zoonotică a fost confirmată prin tipizarea moleculară a tulpinilor identice izolate atât de la oameni, cât și de la animalele de companie. Deși nu există dovezi directe ale transmiterii de la persoană la persoană a *C. ulcerans*, această cale de transmitere nu poate fi exclusă.

Infecția umană cu *C. pseudotuberculosis* se întâlnește rar și de obicei se manifestă prin limfadenită granulomatoasă supurativă localizată recurentă. Este o boală profesională a ciobanilor, tunsorilor, muncitorilor din abatoare și măcelarilor, leziunile pielii fiind o potențială poartă de infecție. Consumul de lapte infectat nepasteurizat poate reprezenta, de asemenea, un risc de infecție umană.

3

Situația epidemiologică la nivel global și în țară

După o perioadă de 20 ani (1971-1990), epidemic favorabilă, când în Republica Moldova se înregistrau în mediu anual 3 cazuri de difterie, în anii 1994-1996 infecția difterică a căpătat o răspândire epidemică.

În 1991, sub influența epidemiilor de difterie din Federația Rusă și Ucraina, situația epidemiologică din Republica Moldova s-a agravat, așa că pe parcursul anilor 1991-1993 cazuri de boală și portaj se înregistrau în focare solitare și multiple, preponderent în spitalele de psihiatrie și școlile speciale pentru copii din localitățile rurale. Cazurile de import și cele de contact direct legate cu ele constituiau circa 40% din numărul total. Letalitatea a crescut de la 0 în 1991 la 4,5% în 1992 și 11,4% în 1993. În toamna anului 1994 răspândirea difteriei a căpătat un caracter epidemic. Pe parcursul anilor 1994-1996 s-au înregistrat 376 (8,64%000); 418 (9,61%000) și 94 (2,17%000) cazuri de difterie și 617; 508; 196 purtători ai corinebacteriilor difterice toxigene, respectiv. Prin difterie pe parcursul anilor epidemici 1994-1996 au fost afectate 90,9% din teritoriile administrative ale țării. Cele mai multe cazuri de boală și portaj au fost înregistrate anual pe parcursul lunilor octombrie-decembrie. Difteria a afectat populația din toate grupele de vârstă, însă mai intens copiii de vârstă școlară.

Efectuarea măsurilor active antiepidemice, în special, imunizarea în masă a populației împotriva difteriei, profilaxia antibiotică în focarele de infecție, a contribuit la scăderea bruscă a intensității procesului epidemic de difterie pe teritoriul Republicii Moldova. Rata de scădere a incidenței difteriei a fost datorită volumului și complexității imunizării tuturor grupelor de vârstă ale populației, calității preparatelor vaccinale, frecvenței revaccinărilor și imunogenității adecvate a vaccinurilor folosite. Preparatele vaccinale utilizate optim, au oferit rezistență la difterie la un nivel de peste 95%, ceea ce a fost suficient pentru a limita procesul epidemic la nivelul morbidității sporadice.

Astfel, după 2001 în Republica Moldova cazuri de difterie și purtători ai corinebacteriilor difterice toxigene nu au fost înregistrate.

Ultimele epidemii vaste din Europa au fost în Federația Rusă și fostele republici ale URSS în anii 1990-1998, fiind înregistrați mai mult de 157 000 bolnavi și 5 000 decese.

Difteria rămâne o problemă majoră pentru țările în curs de dezvoltare. Boala practic nu se înregistrează în țările dezvoltate, dar în țările cu standard general scăzut, la unele grupe sociale, mortalitatea este încă de 5-10%. Chiar și în Franța, în ultimii ani, s-au semnalat cazuri rare de infecții sistemice, septicemie, osteo-articulare, vaginale cu *Corynebacterium diphtheriae*.

C. ulcerans este un comensal la cai și bovine și a fost izolat din laptele de vacă. *C. ulcerans* provoacă difteria faringiană și cutanată, mai frecvent în lunile de vară, în zonele rurale și în rândul persoanelor care îngrijesc vite. Infecția cu *C. ulcerans* este o zoonoză, iar transmiterea de la persoană la persoană nu a fost stabilită.

C. pseudotuberculosis provoacă limfadenită granulomatoasă supurată și un sindrom de pneumonie eozinofilică în rândul persoanelor care se ocupă de cai, vite, capre și căprioare, sau celor ce beau lapte nepasteurizat.

Imunizarea contra difteriei este inica metodă sigură de prevenire a infecției, reduce răspândirea acestei maladii și numărul cazurilor de complicații grave și decese. Tratamentul specific al difteriei, mai cu seamă în formele toxice cu afectarea miocardului, neuronilor, rinichilor, rămâne a fi dificilă, mortalitatea fiind de 5-10%.

Vaccinarea antidifterică primară constă din administrarea a 3 doze de vaccin combinat cu conținut de anatoxină difterică, la vârsta de 2, 4, 6 luni și o revaccinare la 22-24 luni. La copii se aplică revaccinări la vârstele de 7 și 15 ani. Adulții trebuie să primească revaccinări antidifterice o dată în 10 ani. Imunizarea contra difteriei se efectuează gratuit copiilor și adulților la medicul de familie. În țară se folosesc doar vaccinuri calitative de la producători precalificați de Organizația Mondială a Sănătății.

Sursa de infecție este omul bolnav cu forme tipice și atipice ale difteriei, purtătorii de bacili difterici (*C. diphtheriae*) toxigeni și mai rar animale sălbatice și domestice (*C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*).

Mecanismul de transmitere. Transmiterea poate fi directă pe cale aeriană prin picături de secreții, secreții nazofaringiene în procesul vorbirii, tusei, strănutului și indirectă, prin obiecte de uz contaminate cu secreții. Infecția umană cu *C. pseudotuberculosis* se întâlnește rar și este o boală profesională. Calea alimentară de transmitere este excepțională (lapte crud).

Receptivitatea este generală. Deși este o boală a copilăriei, în ultimul timp difteria s-a deplasat spre grupele de vârstă mai înaintată.

Copiii născuți de mame imune mențin o imunitate pasivă 4-6 luni.

Sezonalitatea difteriei – toamnă-iarnă.

Imunitatea antitoxică se instalează după vaccinare sau după boală. Titrul minim de anticorpi antitoxici de protecție este de 0,03 UA/ml.

4

Fiziopatologia și aspectele clinice

PATOGENIE

Poartă de intrare pentru bacili difterici poate fi: mucoasa faringoamigdaliană, laringiană, nazală, conjunctivală, genitală, pielea lezată, urechea. Primele trei sunt cele mai frecvente, celelalte în prezent nu se înregistrează mai rar. Bacili difterici se multiplică la poarta de intrare și nu pătrund în sânge. Local, toxina difterică produce o inflamație a mucoasei, necroză coagulantă a epiteliului și o alterare a pereților vasculari. Ca rezultat, apare un exsudat ce conține proteine, în special fibrinogen, care, sub acțiunea trombochinazei, din masa necrotică se transformă în fibrină, formând la suprafața mucoasei o membrană fibrinoasă (pseudomembrană, membrană falsă) consistentă și aderentă, caracteristică difteriei faringoamigdalienne. În laringe și trahee, mucoasa fiind acoperită cu un strat de epiteliu cilindric, membrana fibrinoasă va fi mai puțin aderentă și se va detașa ușor.

Microscopic, membrana falsă este constituită din 3 straturi:

- 1) superficial, din celule necrozate și diverși germeni;
- 2) mediu – cu fibrină;
- 3) profund, format din detrită celulară, bacili difterici și leucocite.

Din focarul local de inflamație, toxina difterică pătrunde în căile limfatice, producând edem al mucoaselor, în ganglionii limfatici regionali, afectându-i, apoi difuzează în sânge. Resorbția toxinei se produce în cantități mai mari în zona faringelui, amigdalelor și mai puțin în zona laringelui. De aici rezultă gradele variate de toxemie.

În circulație, toxina se fixează rapid pe diverse celule, producând fenomene de degenerescență. Toxina difterică posedă o afinitate deosebită față de miocard, rinichi și țesutul nervos, realizând complicații specifice. Toxina fixată pe celule nu mai poate fi neutralizată cu antitoxina din serul antidifteric, iar celula nu mai e în stare să sintetizeze proteină și pierde.

În difteria toxică apare edem considerabil faringian și cervical, hemoragii, coagulopatie de consum, iar în forma malignă se instalează stare de șoc toxiinfecțios, insuficiență renală și suprarenală. Declanșarea formelor grave și maligne ale difteriei este favorizată nu doar de toxigenitatea deosebită a tulpinilor de bacili difterici și lipsa apărării locale, ci și de antecedentele personale ale bolnavului: sensibilizare, boli repetate etc.

În difteria laringiană resorbția toxinei este insuficientă pentru realizarea fenomenelor toxice la distanță. Stenoza laringiană (crupul difteric) apare în urma spasmului reflector al mușchilor laringelui. Edemul mucoasei, membranele ce se detașează ușor, secrețiile laringiene pot fi cauze excepționale ale asfixiei.

În difterie, pe parcursul bolii se formează imunitate antitoxică dură, dar care nu este de lungă durată, astfel sunt posibile îmbolnăviri repetate. Imunitatea antidifterică postvaccinală este la fel temporară, făcând necesară revaccinarea. De rând cu imunitatea antitoxică, în difterie apare și imunitate antimicrobiană la antigenele membranei celulare a corinebacteriilor difterice.

MORFOPATOLOGIE

Cea mai frecventă cauză a deceselor în difterie este miocardita toxică. În miocard se constată edem, infiltrație celulară, leziuni de degenerescență a fibrelor miocardice și a sistemului de conducere. În sistemul nervos periferic sunt modificări degenerative în neuroni și fibrele nervoase – nevrite toxice periferice. În rinichi predomină leziunile tubulare (nefroză), în alte organe – leziuni de degenerescență.

În formele toxice și malignă pot fi hemoragiile multiple în viscere, tunici, suprarenale (atrofie, necroză). În faringe, pe amigdale, uneori în laringe, pe mucoasa bucală și nazală se constată membrane fibrinoase. Amigdalele sunt tumefiate cu focare de necroză și hemoragii, cu mucoasa hiperemiată și edemațiată. Ganglionii limfatici submandibulari sunt tumefiați cu edem periglandular. Edemul ocupă uneori toată zona cervicală și poate fi răspândit pe torace. În sistemul nervos central – edem, hemoragii. Mai rar pot fi hemoragiile sau atrofia suprarenalelor (sindromul Waterhouse-Friderichsen).

Clasificarea formelor clinice

I. Conform localizării morfologice în ordinea frecvenței:

- difteria faringoamigdaliană (angina difterică) – 86-90%;
- difteria laringiană primară și secundară;
- difteria nazală;
- alte localizări (conjunctivală, cutanată, otică, genitală).

II. Difteria faringoamigdaliană (orofaringiană):

- localizată: membranoasă, insulară, eritematoasă;
- difuză (extinsă);
- subtoxică;
- toxică: gr. I, gr. II, gr. III;
- hipertoxică;
- hemoragică.

III. Difteria faringoamigdaliană asociată cu alte localizări, dintre care cele mai frecvente sunt difteria faringoamigdaliană + laringiană sau nazală etc.

TABLOUL CLINIC

Perioada de incubație durează 2-7 zile, maxim 12 zile.

Difteria faringoamigdaliană localizată membranoasă. Debutul bolii este lent, progresiv, cu febră care depășește rareori 38 °C, astenie, anorexie, dureri la deglutiție. În prima zi a bolii, tabloul obiectiv prezintă mucoasele faringoamigdalieni congestionate. În ziua a doua pe amigdale apar membrane false de culoare albă-sidefie, fine, ca un văl ușor detașabil. Aceste membrane albe-cenușii, uneori gălbui, în continuare (în a 3-a - a 4-a zi) se răspândesc pe toată suprafața amigdalelor, devin compacte, dure, greu detașabile. La detașarea lor forțată, lasă mucoasa sângerândă. După 2-3 ore, dacă nu s-a administrat serul antidifteric (antitoxina difterică), membranele se refac rapid. Membranele false difterice au un caracter fibrinos, din care cauză între două lame de sticlă nu se strivesc, iar într-un pahar cu apă se scufundă. Edemul faringian și cervical lipsește. Ganglionii limfatici amigdalieni sunt ușor tumefiați, duri, moderat dureroși. Semnele de intoxicație generală sunt moderate. Afecțiuni de organe la distanță nu apar. Difteria faringoamigdaliană membranoasă localizată la copii imunizați frecvent evoluează spre vindecare completă, chiar și în cazuri netratate cu ser antidifteric. După administrarea serului antidifteric, temperatura corpului scade a doua zi, starea se ameliorează, membranele false dispar după 2-3 zile, uneori – după 4-5 zile. Complicații nu apar. În cazul în care nu s-a administrat ser antidifteric, membranele persistă 7-10 zile, febra, intoxicația durează mai mult timp, pot apărea complicații (miocardită, pareza vălului palatin), iar uneori boala progresează în formă difuză. Este posibilă și extinderea membranelor pe faringe, laringe, nas (forma mixtă), și progresarea spre o formă toxică.

Formele atipice ale difteriei faringoamigdalieni localizate (insulară și eritematoasă) au aspectul anginelor foliculare și eritematoasă, însă sunt posibile complicații specifice (uneori grave) ca și în difteria tipică.

Difteria faringoamigdaliană difuză este caracterizată prin semne toxice mai pronunțate și membrane false situate nu numai pe amigdale, dar și pe stâlpul palatini, uvulă, mucoasa faringelui, având același caracter fibrinos. Edemul faringian și cervical nu apare. Ganglionii limfatici amigdalieni sunt tumefiați și moderat dureroși. Poate servi ca etapă de trecere de la forma localizată la cea toxică.

Difteria faringoamigdaliană toxică se declanșează ca formă primară sau secundară (din cea localizată sau difuză). Forma primitivă are un debut brusc, brutal cu hiperpirexie, grețuri, vărsături, anorexie, cefalee, astenie, adinamie (bolnavii nu se pot ridica din pat), uneori apar convulsii, tulburări de conștiință, semne meningiene pozitive. Durerile la deglutiție pot fi slabe. Respirația nazală este îngreunată, zgomotoasă. Apare edem cervical moale, nedureros, pielea fiind nemodificată. Se marchează paliditate cutanată foarte pronunțată.

În faringe se constată un edem bilateral (rareori asimetric) al mucoaselor și al amigdalelor, congestie slabă cianotică, membrane false compacte, dure, fibrinoase pe amigdale (situate plus țesut), stâlpul palatini, luetă, faringe, uneori pe laringe și mucoasa nazală. Aceste membrane false apar și se răspândesc rapid. Ganglionii limfatici amigdalieni sunt tumefiați, duri, dureroși, neaderenți, uniformi.

Criterii de severitate: gradul de intoxicare și nivelul de răspândire a edemului cervical, care în forma subtoxică este periglandular sau unilateral, în forma toxică de gradul I este răspândit până la plica cutanată medie cervicală, de gradul II – până la clavicule și de gradul III – sub clavicule, luând în considerare și răspândirea edemului pe obraji și spre ceafă, hepatita toxică, nefrita toxică, insuficiența cardiovasculară.

Evoluția difteriei faringiene toxice depinde de începutul seroterapiei și al tratamentului complex. În cazul administrării serului antidifteric, în prima zi a bolii intoxicația cedează, edemul cervical și faringian, membranele false dispar la a 6-a - a 8-a zi. În caz contrar, boala progresează, apar complicații, survine decesul.

Forma hemoragică a difteriei faringoamigdalienne este caracterizată prin semne clinice ale difteriei toxice (gradele I-II), în care în ziua a 2-a - a 3-a a bolii se declanșează sindromul de coagulare intravasculară diseminată. Apar hemoragii cutanate, epistaxis, melenă, vomă tip „zaț de cafea” etc., membranele false se îmbibă cu sânge. Decesul survine la a 4-a - a 7-a zi a bolii.

Difteria faringoamigdaliană hipertoxică (malignă, fulminantă) are debut brusc, brutal, cu intoxicație gravă, temperatura corpului atinge 39-40 °C, e însoțită de grețuri, vărsături, hemoragii, tulburări de conștiință, convulsii, insuficiență cardiovasculară, hepatomegalie, nefrită toxică. Chiar în debutul bolii se instalează edem intens al mucoasei faringiene și palatine și congestia lor, concomitent apărând membrane false de culoare cenușie murdară care se extind pe amigdale, vălul palatin, luetă, faringe și se pot extinde pe mucoasa nazală și laringe. Din gură și nas se scurge o secreție serosangvinolentă fetidă. Semnele de intoxicație deseori precedă procesul local. Evoluția bolii poate fi fulminantă, când apar semne de șoc toxiinfecțios (paloare intensă, marmorare, acrocianoză, membre reci, dispnee, tahicardie, zgomotele cordului asurzite, hipotensiune arterială, oligurie) și decesul survine în 24-36 de ore de la debut; acută – exitusul survine în câteva zile sau subacută – cu deces după 5-6 zile.

Difteria laringiană (crupul difteric) se întâlnește mai frecvent la copiii de 1-5 ani. Poate fi o manifestare izolată a difteriei (20%) sau apare secundar (80%), prin extinderea procesului din faringe. Crupul difteric poate fi localizat (în laringe) și difuz (în laringe, trahee, bronhii).

Pentru debut sunt caracteristice: febra, răgușeala, tusea uscată și aspră, spasmodică, lătrătoare. Vocea răgușită treptat se șterge până la afonie. Aceasta este faza I, disfonică, care durează 2-3 zile. Laringoscopia indică edem și congestie a mucoasei. Faza a II-a, dispneică (stenotică), se caracterizează prin febră, agitație, afonie, tuse afonică, respirație zgomotoasă, șuierătoare, tiraj (depresiune inspiratorie a părților moi ale cutiei toracice) și durează 2-3 zile. Laringoscopia indică edem, congestie a mucoaselor glotei, epiglotei, coardelor vocale și membrane false. În faza a III-a, asfixică, bolnavul este somnolent, cu extremitățile reci, cianoză, acrocianoză, pulsul slab, filiform, neregulat, hipotonie arterială, dispnee, polipnee, accese de sufocație, afonie, tuse afonică, convulsii, inconștiență. Survine coma și decesul. În perioada de trecere de la stenoză (faza a II-a) la asfixie (faza a III-a) apar semne de insuficiență respiratorie. Pacientul refuză hrana, nu doarme, nu se joacă, este neliniștit, fața reflectă o frică, tegumentele sunt reci și umede, se constată cianoza periorală și a buzelor. Pulsul, slab palpabil, devine paradoxal. În cazul în care seroterapia a fost inițiată precoce, semnele de stenoză laringiană se vor corecta în 18-24 de ore; inițial se va ameliora respirația, apoi tusea va deveni umedă, vocea însă va fi afonică, apoi răgușită persistă încă 4 zile după dispariția stenozei. În această perioadă, membranele difterice se detașează ușor și, iritând mucoasa, pot provoca spasm reflector și asfixie.

Difteria laringiană la adulți prezintă unele particularități: din cauza laringelui mai larg, triada simptomelor de crup (glas răgușit, tuse lătrătoare, respirație stenotică) poate lipsi, iar uneori glasul răgușit este unicul semn.

Difteria laringiană primară tratată precoce, de obicei, se vindecă complet. În formele mixte pot surveni complicații specifice, pneumonia și decesul.

Difteria nazală poate fi primară sau secundară prin extinderea procesului din faringe. Poate fi localizată, difuză (pe sinusuri nazale) și toxică. Prezintă o rinită cu exsudat seros sau serosangvinolent, cruste hemoragice și membrane false, cu erodarea narinei și a tegumentului învecinat.

Difteria conjunctivală prezintă membrane false, edem și hiperemie a conjunctivei, edem palpebral. Procesul poate fi unilateral și bilateral. Starea generală nu suferă.

Difteria cutanată apare în plăgi, excoriații și alte leziuni, cu edem și membrane fibrinoase. Frecvent cu suprainfecții strepto-stafilococice.

Difteria otică și difteria vulvovaginală sunt forme foarte rare, fiind suspectate după prezența membranelor false.

Difteria la copiii neimunizați evoluează mai grav, sunt frecvente formele toxice ale difteriei faringoamigdalienne (la copiii mici – 65%). Este posibilă forma hipertoxică. Se înregistrează difteria laringiană. Se întâlnesc forme cu localizări multiple. Au fost semnalate cazuri de difterie cutanată (Bolivia, SUA) care anterior nu se înregistrau. Sunt mai frecvente complicațiile specifice. Deseori se asociază infecția virală sau bacteriană, care agravează evoluția și consecințele difteriei. În aproximativ 90% din cazuri boala este cauzată de *C. diphtheriae* tip gravis, toxigen. Letalitatea constituie 3,0-5,8%.

Difteria la copiii imunizați. Este cunoscut că imunitatea antitoxică obținută prin vaccinarea antidifterică nu întotdeauna protejează împotriva infecției. Însă cei imunizați se îmbolnăvesc mai rar decât cei neimunizați. Cea mai frecventă formă clinică la ei este difteria faringoamigdaliană localizată membranoasă. Formele grave și cele cu localizări multiple se întâlnesc rar (5,6% și 2,1%, corespunzător). Dintre cele grave pot fi formele subtoxică și toxică de gr. I. Formele cu localizări multiple evoluează ușor și apar rar (3%). Difteria laringiană nu se înregistrează.

Difteria faringoamigdaliană localizată, fiind cea mai frecventă la copiii imunizați, se caracterizează prin febră (37-38 °C) cu durata de 2-3 zile, semne toxice moderate sau absente. La 1/3 din bolnavi a fost constatată angina difterică unilaterală Marfan. Membranele pot fi mai puțin compacte, nu întotdeauna aderente, dispar după 4-6 zile (în cazul în care bolnavii n-au fost tratați cu ser antidifteric). Mai mult de 1/2 din copii se vindecă ușor chiar și fără seroterapie. Complicații apar foarte rar, cea mai frecventă fiind pareza n. glosofaringian. Sunt frecvente formele ușoare atipice – difteria faringiană eritematoasă și difteria faringoamigdaliană insulară, în care numai examenul bacteriologic pozitiv permite diagnosticul difteriei. Acești bolnavi prezintă pericol epidemiologic.

La copiii imunizați, care nu au format o imunitate stabilă, difteria va evolua grav, la fel ca și la cei neimunizați.

Deci, imunizarea împotriva difteriei, chiar dacă nu preîntâmpină întotdeauna boala, face ca copiii care s-au îmbolnăvit să suporte boala ușor fără complicații și să evite decesul.

În baza celor mai sus-menționate, OMS a aprobat un program global de imunoprofilaxie, care prevede acoperirea vaccinală de 95% cu vaccin antidifteric a copiilor în vârstă de până la 2 ani.

COMPLICAȚII. Complicațiile difteriei se datorează toxinei difterice. Complicațiile toxice sunt frecvente în formele toxice ale difteriei și în caz de seroterapie tardivă.

Miocardita toxică difterică poate fi precoce și tardivă. Este cea mai frecventă complicație a difteriei. În difteria toxică de gr. I-II, această complicație se înregistrează în 80-100% din cazuri. Miocardita precoce (33% din cazuri) survine în primele 10 zile ale bolii, manifestându-se prin tahicardie, aritmie, zgomote cardiace asurzite, colaps, puls filiform, dispnee, hepatomegalie, apoi stop cardiac. Miocardita tardivă (66% din cazuri) survine în a 2-a și a 3-a săptămână a bolii, după dispariția semnelor de intoxicație și a manifestărilor clinice locale. Pe electrocardiogramă apar modificări în 20-30% din cazuri, chiar când nu sunt prezente semnele clinice: voltaj scăzut, tahicardie sinusală cu bloc atrioventricular, disociație atrioventriculară, unda T negativă, semne de alterare miocardică difuză. Miocardita tardivă are o evoluție benignă, deseori spre vindecare completă. Miocardita toxică difterică poate decurge în forme ușoare, medii și grave.

Paraliziile periferice, considerate complicații toxice ale difteriei, pot fi precoce și tardive. Paraliziile precoce apar în prima și a doua săptămână a bolii cu lezarea nervilor cranieni. Paralizia vălului palatin – cea mai frecventă complicație nervoasă a difteriei – se manifestă prin vorbire nazonată, regurgitația lichidelor pe nas. Vălul palatin este flasc și imobil. Lueta se deplasează spre partea sănătoasă și nu contractează la atingere cu spatula.

Paraliziile de nervi oculomotori cu slăbirea sau pierderea reflexelor de acomodare (n. ciliaris) la distanță apar între a 4-a și a 5-a săptămână a bolii (paralizii tardive). Concomitent apar paralizii ale n. abducens (strabism), n. facialis. Pot apărea paralizii ale mușchilor faringieni, laringieni, respiratorii. Nevritele periferice sunt, de regulă, cele mai tardive (a 7-a - a 10-a săptămână). Sunt paralizii flasce cu hipotonie musculară, parestezii, areflexie, ataxie, atrofie musculară.

Evoluția complicațiilor nervoase este favorabilă cu recuperare completă. Pericol pentru viață prezintă numai paraliziile mușchilor respiratorii.

Nefroza toxică (necroza tubulară) apare în perioada de stare a difteriei toxice și este caracterizată prin albuminurie masivă, cilindrurie, leucociturie care dispar odată cu cedarea manifestărilor toxice.

Difteria la sugari. Copiii în vârstă de până la 1 an rar se îmbolnăvesc de difterie. Foarte rar fac difterie nou-născuți și copiii de 3-6 luni. Se înregistrează difteria nazală și laringiană.

Difteria nazală la sugari apare treptat cu subfebrilitate sau temperatură normală, fără manifestări toxice. Pe mucoasa nazală hiperemiată și edemată nu apar membrane false, ci eroziuni, cruste. Secrețiile nazale posedă un caracter mucosangvinolent. Pielea la intrare în cavitatea nazală este cu excoriații, cruste. Copilul nu poate să sugă pieptul mamei, slăbește ponderal. În lipsa seroterapiei pot surveni complicații: miocardită, poliradiculonevrită.

Difteria laringiană (crupul difteric) la nou-născuți și la sugari în vârstă de până la 3 luni, care au aparatul neuromuscular laringian insuficient dezvoltat, are particularitățile ei. Tusea lătrătoare și respirația zgomotoasă stenotică sunt slab pronunțate. Afonia este prezentă în toate cazurile. La sugarii mai mari de 3 luni, tabloul clinic al crupului difteric este clasic, însă boala evoluează rapid, astfel că asfizia se instalează în 1-2 zile de la debutul bolii.

Difteria faringoamigdaliană toxică la sugari până la 6 luni nu se întâlnește, la cei de 6-12 luni se manifestă tipic. Cea mai frecventă complicație a difteriei la sugari este pneumonia. Letalitatea în difterie la sugari este mai mare decât la copiii mai mari.

Difteria la adulți. În perioada ascensiunilor epidemice, difteria se înregistrează frecvent la adulți (45-55%) și evoluează, de regulă, în forme ușoare, inclusiv atipice, dar și în forme grave toxice.

Difteria faringoamigdaliană localizată membranoasă este cea mai frecventă formă clinică la adulți. Boala evoluează ca o angină „albă” (lacunară, foliculară), cu semne de intoxicație mai mult sau mai puțin pronunțate, însoțite de dureri moderate la deglutiție, febră. Mucoasele faringiene sunt congestionate, amigdalele tumefiate, acoperite cu membrane de culoare albă-cenușie sau gălbuie, compacte, care deseori se detașează ușor, iar uneori sunt unilaterale. Membranele tipice pot fi absente la 2/3 din bolnavi. La o mare parte din bolnavi boala evoluează ușor spre vindecare completă chiar și fără seroterapie (unii dintre ei nici nu apelează la medic, tratându-se cu antibiotice). La alții în a 2-a – 3-a săptămână a bolii apar complicații specifice, în special neuropatii.

La adulți se declanșează și forme toxice ale difteriei, care uneori se asociază cu difteria laringiană sau/și nazală, evoluează grav și frecvent spre deces. Apar complicații toxice, miocardita, fiind cea mai frecventă. În 1/3 din cazuri difteria e combinată cu infecția strepto-stafilococică care agravează prognosticul și conduce la erori de diagnostic. Letalitatea este mai mare la adulți.

Importanța rapidității împreună cu precizia sunt esențiale atunci când se efectuează procedurile de laborator. Se recomandă ca proba/izolatul să fie considerat toxigen până la proba contrarie. Gama și profunzimea investigației depind de capacitățile de care dispune laboratorul, adică de disponibilitatea reactivilor, de experiența personalului de laborator și de resursele financiare.

5.1. CRITERII DE SCREENING A SPECIMENELOR SUSPECTE LA *CORYNEBACTERIUM* SPP.

Datorită prevalenței relativ scăzute a difteriei, screeningul tampoanelor recoltate din faringe, nu este efectuat de rutină în multe țări. Prin urmare, este important să se examineze speciemele pentru *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* dacă există riscuri specifice raportate.

Definiția unui caz suspect de difterie care indică colectarea prelevatului din gât și nas în conformitate cu Standardele de supraveghere ale OMS pentru difterie sunt enumerate mai jos:

Criterii clinice

Orice persoană care prezintă cel puțin una dintre următoarele forme clinice:

Difterie respiratorie clasică:

O afecțiune a tractului respirator superior manifestată prin laringită sau rinofaringită sau amigdalită și o membrană/pseudomembrană aderentă.

Difterie respiratorie ușoară:

O afecțiune a tractului respirator superior manifestată prin laringită sau rinofaringită sau amigdalită fără o membrană/pseudomembrană aderentă.

Difterie cutanată:

Leziuni ale pielii.

Difterie cu alte localizări:

Leziuni ale conjunctivelor sau ale mucoaselor.

Criterii de laborator pentru diagnostic

1. Izolarea *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* sau *Corynebacterium pseudotuberculosis* producătoare de toxine dintr-o probă clinică.
2. Diagnostic histopatologic al difteriei.

Criterii epidemiologice

Cel puțin una dintre următoarele legături epidemiologice:

- transmitere de la om la om;
- transmitere de la animal la om.

Clasificarea cazurilor

A. Caz posibil

Orice persoană care îndeplinește criteriile clinice pentru difterie respiratorie clasică.

B. Caz probabil

Orice persoană care îndeplinește criteriile clinice pentru difterie (difterie respiratorie clasică, difterie respiratorie ușoară, difterie cutanată, difterie cu alte localizări) care are o legătură epidemiologică cu un caz uman confirmat sau care are o legătură epidemiologică implicând transmitere de la animal sau la om.

C. Caz confirmat

Orice persoană care îndeplinește criteriile de laborator și care prezintă cel puțin una dintre formele clinice.

5.2. COLECTAREA, DEPOZITAREA ȘI TRANSPORTAREA PROBELOR DIN CAZURI SUSPECTE DE DIFTERIE RESPIRATORIE SAU CUTANATĂ ȘI CONTACTI

Procedurile de colectare a probelor induc, de obicei, tuse, strănut și lăcrimare, din aceste considerente lucrătorii din domeniul sănătății care colectează probe trebuie să fie protejați corespunzător și să urmeze ghidurile naționale. Sunt necesare măsuri de precauție pentru picături, inclusiv o mască chirurgicală și protecție pentru ochi. În plus, lucrătorii medicali care colectează tampoanele trebuie să se asigure că sunt vaccinați conform programului și că rapelul împotriva difteriei este la zi.

Colectarea probelor pentru testarea de laborator

Izolarea cu succes a tulpinilor de *C. diphtheriae* depinde de colectarea corectă a tampoanelor și de transportarea rapidă a acestora în laborator. Deoarece difteria este cel mai frecvent o infecție a tractului respirator superior, trebuie recoltate probe din orofaringe, na-

zofaringe sau ureche. Dacă este prezentă o pseudomembrană, trebuie colectat un tampon de sub membrană, precum și o bucată de țesut (dacă este posibil). În caz că este suspectată difteria cutanată, deseori imposibil de diferențiat de orice altă piodermie, în special acolo unde difteria este endemică, se recoltează tampoane din orice plagă sau leziune cutanată. În mod ideal, probele ar trebui colectate la debutul simptomelor și înainte de terapia antimicrobiană sau antitoxică. Toate probele trebuie transportate la laborator imediat după colectare sau păstrate la 4-8 °C dacă sunt întârzieri de transportare.

Specimenele post-mortem din tractul respirator superior și organe vitale pot fi examinate în cazurile în care este necesară o autopsie pentru a determina dacă difteria a fost cauza decesului.

În mod ideal, la fiecare caz suspect trebuie recoltate două tampoane aplicatoare Dacron sau floccate, care sunt plasate într-un mediu de transport semisolid de rutină (ex. Amies) și transportate imediat în laborator. Tampoanele trebuie etichetate corespunzător cu un număr unic și sursa specimenului.

Clinicianul trebuie să informeze laboratorul cu privire la orice diagnostic prezumtiv de difterie.

Transportul, conservarea, depozitarea și reanimarea culturilor

Dacă transportul probelor la laborator nu poate fi realizat imediat (în decurs de 2-8 ore de la recoltare), probele trebuie păstrate la 4-8 °C. În cazul în care mediul Amies nu este disponibil, pot fi utilizate alte medii de transport disponibile în comerț (ex. Stuart).

Odată ce un izolat a fost identificat prezumtiv ca fiind pozitiv pentru *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* sau *C. pseudotuberculosis*, este important să se păstreze izolatul sub formă de cultură pură. Acest izolat poate fi trimis la un laborator de referință sau păstrat în laborator pentru testare ulterioară.

Modalitățile tradiționale de depozitare a izolatelor includ:

- 1) Pe termen scurt (până la 7 zile): inoculat pe o placă cu agar, incubat la 35-37 °C peste noapte și păstrat la frigider la 4 °C;
- 2) Pe termen lung: crioconservarea/congelare la -20 °C până la -80 °C în bulion cu glicerol; în mediu care conține lapte degresat, triptonă, glicerol și glucoză – STGG; sau în tuburi care conțin criobile.

Izolatele pentru depozitare trebuie cultivate sub formă de cultură pură timp de cel mult 24 de ore pe mediile agar sânge sau agar de soia tripticază. Mediile care conțin telurit sau antibiotice nu trebuie utilizate în acest scop. Tubul de depozitare trebuie să fie etichetat cu numărul de identificare a izolatului și data recoltării pentru a fi posibilă conexiunea cu informațiile despre pacient.

Pentru revigorarea tulpinilor din STGG congelate sau criotuburi, este necesar să se lucreze într-un cabinet de biosecuritate conform protocolului de siguranță al laboratorului. Tuburile cu tulpini nu trebuie dezghețate complet și trebuie returnate în congelator cât mai curând posibil după subcultură.

6.1. PROCEDURI DE LABORATOR PENTRU IZOLAREA PRIMARĂ A CORINEBACTERIILOR POTENȚIAL TOXIGENE

Probele colectate trebuie inoculate cât mai curând posibil pe mediul de cultură primar adecvat, deoarece tampoanele pot conține un număr mic de corinebacterii. De asemenea, întârzierile pot permite florei normale din locul colectării să suprimă cultura prin creșterea excesivă. Din aceste considerente, mediul seric Loeffler nu este ideal pentru izolarea primară. Diagrama de flux din Fig. 1 redă ordinea recomandată a procedurilor pentru diagnosticul de laborator al difteriei și infecțiilor asociate.

Probe umane pentru diagnosticul microbiologic al difteriei (nazofaringe, faringe, tampon cutanat și alte părți ale corpului, pseudomembrane)

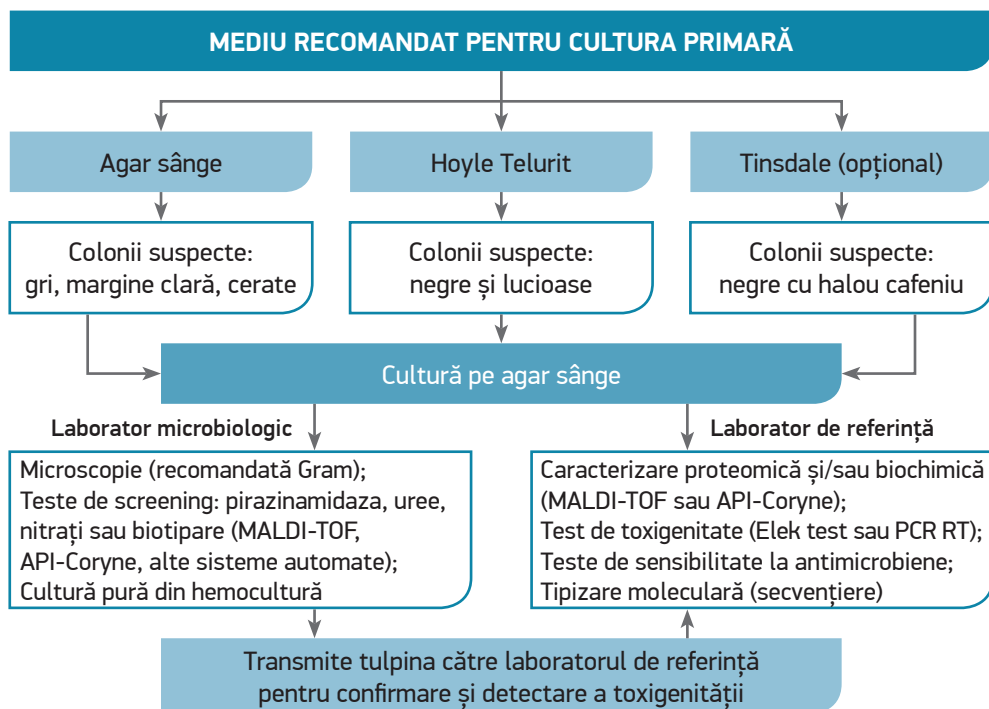


Fig. 1. Proceduri recomandate și ordinea de urmat pentru diagnosticul de laborator al difteriei și infecțiilor asociate

6.2. CULTURA PRIMARĂ ȘI IZOLAREA

Dacă tamponul primit în laborator nu a fost plasat în mediu de transport, atunci acesta trebuie umezit cu câteva picături de bulion nutritiv steril timp de câteva minute înainte de inoculare. Dacă se află în mediu de transport, atunci se inoculează direct pe plăcile de agar.

Mediile de cultură minime necesare pentru izolarea *C. diphtheriae* și a altor corinebacterii potențial toxigene sunt agar-sânge și agar-sânge cu telurit. Tampoanele sunt inoculate mai întâi pe un sfert din suprafața plăcii de agar cu sânge și apoi pe placa de Hoyle telurit sau mediu Tinsdale. Folosind anse sterile, se va repartiza proba pe fiecare placă și se vor incuba la 36-37 °C, în condiții aerobe. Examinarea plăcilor se va realiza după 18-24 de ore de incubare, apoi se vor reincuba încă 24 de ore.

6.3. CRITERII DE RECUNOAȘTERE A COLONIILOR SUSPECTE CARE NECESITĂ O EVALUARE ULTERIOARĂ

Plăcile primare trebuie examinate după 18-48 de ore de incubație, pentru a subcultiva și a confirma coloniile suspecte cât mai repede posibil. De asemenea, este recomandabil de examinat morfologia coloniei cu o lupă de mână în lumină reflectată. Dacă nu există o creștere vizibilă pe agar-sânge, atunci trebuie solicitate imediat alte tamponane, deoarece acestea probabil nu au fost recoltate corespunzător. Deși rar izolat, biovarul *intermedius* va crește între 48 și 72 de ore; acesta este biovarul cu creștere lentă din cadrul speciei *C. diphtheriae*.

Placa cu agar-sânge este utilă pentru detectarea streptococilor β-hemolitici, *Arcanobacterium haemolyticum* și *Staphylococcus aureus*, care pot fi adesea prezenți. În plus, unele tulpini din *C. diphtheriae* sunt sensibile la teluritul de potasiu și, prin urmare, vor fi inhibitate pe mediul cu telurit. Este important să se examineze cu atenție placa de agar-sânge pentru orice colonii suspecte de *C. diphtheriae*. Este important de reținut că unele tulpini de *S. aureus*, enterococi și alte microorganisme pot dezvolta colonii negre pe Hoyle agar.

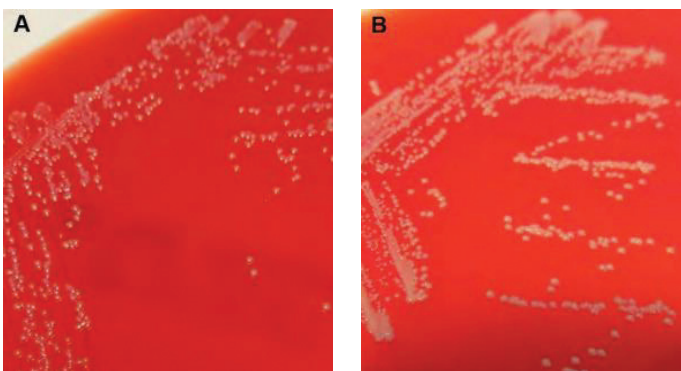


Fig. 2. Morfologia coloniilor de *C. diphtheriae* (A) și *C. ulcerans* (B) pe mediul Hoyle cu telurit

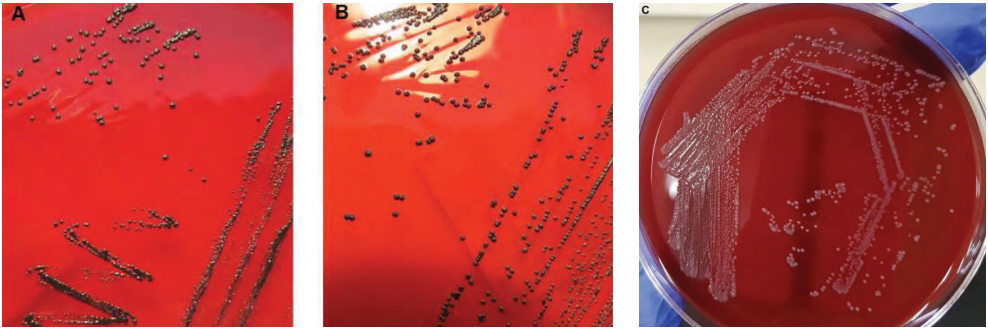


Fig. 3. Morfologia clasică a coloniilor de *C. diphtheriae* și *C. ulcerans* pe mediu agar sânge; *C. diphtheriae* (A și B) și *C. ulcerans* (C)

6.4. IDENTIFICAREA PREZUMTIVĂ ȘI SCREENINGUL SPECIILOR DE *CORYNEBACTERIUM* POTENȚIAL TOXIGENE ȘI NETOXIGENE

Testele, cum ar fi producerea de pirazinamidază (PYZ), uree, nitrat și/sau cistinază pe mediu Tinsdale sau Pizu (opțional) sunt utile pentru identificarea prezumtivă a corinebacteriilor potențial toxigene. Mediul Tinsdale poate fi, de asemenea, utilizat ca mediu de screening primar direct din probele clinice.

Testul cistinazei (Tinsdale)

Mediul Tinsdale este recomandat pentru identificarea prezumtivă a corinebacteriilor potențial toxigene, deoarece detectează enzima cistinaza. Mediul dat este util pentru confirmarea coloniilor suspecte pe medii cu telurit, a tulpinilor slab și puternic producătoare de enzime. Doar *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* vor forma colonii negre caracteristice înconjurate de un halou maro după incubarea peste noapte (Fig. 4).

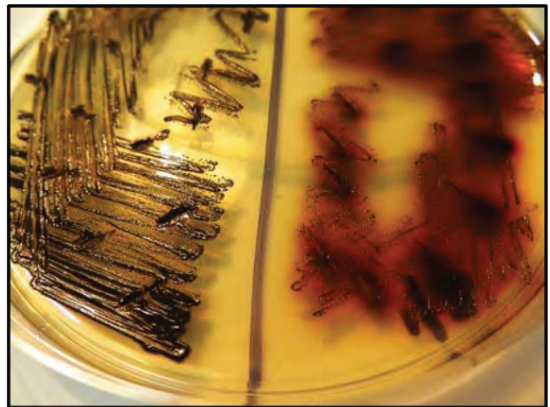


Fig. 4. Testul cistinazei – mediu Tinsdale
Stânga: Alte corinebacterii formează colonii negre (lipsite de halou maro).
Dreapta: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* sau *C. pseudotuberculosis* (prezența haloului maro).

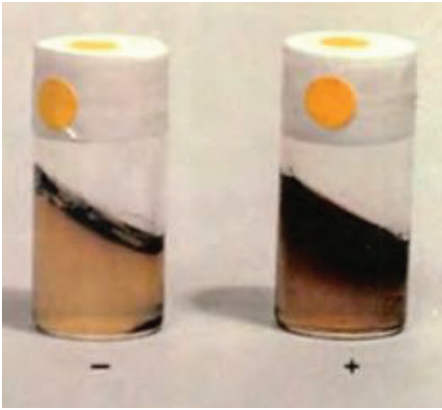


Fig. 5. Testul cistinazei, cultură pe agar în pantă: mediu Tinsdale sau Pizu. Speciile potențial toxigene produc o colorare neagră difuză a mediului (tubul din dreapta).

Testul pirazinamidazei

Este disponibil comercial testul rapid care poate diferenția corinebacterii patogene (*C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* și *C. ulcerans*) de celelalte specii de corinebacterii.

Acest test pentru activitatea pirazinamidazei este un test de screening, tulpinile *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* prezintă o reacție negativă, în timp ce alte corinebacterii sunt pozitive.

Există totuși și alte specii non-toxigene care pot fi și negative la pirazinamidază, de exemplu, *C. macginleyi*, *C. resistens*. Cu toate acestea, testul în sine este simplu, rapid (4 ore) și rentabil.

Este recomandabil să se efectueze regulat controlul calității mediului/testului utilizând tulpini de referință recomandate de producător pentru a asigura recunoașterea morfologiei coloniilor și, astfel, a se asigura că toate testele, mediile și schimbările de culoare funcționează optim.

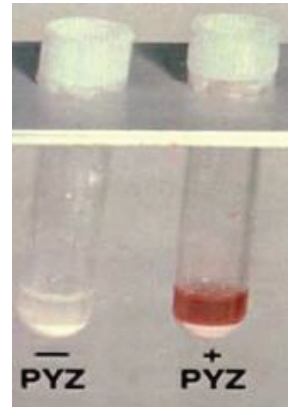


Fig. 6. Testul pirazinamidazei: (negativ – stânga, pozitiv – dreapta).

6.5. EXAMINAREA MICROSCOPICĂ ȘI PROCEDURILE DE COLORARE PENTRU COLONII/CULTURI SUSPECTE

Utilizarea colorației Albert ca metodă primară de colorare este încă utilizată în unele țări ca un indicator de identificare prezumtivă pentru corinebacterii și granulele metacromatice, deși acestea sunt nespecifice pentru *C. diphtheriae*.

Există mai multe tehnici de colorare utilizate în studierea caracterelor morfologice (anexa 2). La efectuarea acestor tehnici prezența bacililor cu capetele măciucate, trebuie să fie

confirmată cu creșterea corinebacteriilor pe medii. Din coloniile suspecte de pe plăcile de agar-sânge, mediul cu telurit sau Loeffler se vor efectua frotiuri pentru colorare.

Caracteristicile microscopice comune ale corinebacteriilor patogene sunt:

- bacili Gram pozitivi mici (unele tulpini de *C. diphtheriae* tind să se decoloreze excesiv și pot apărea Gram variabile);
- bacili drepți cu capetele măciucate care sunt foarte pleomorfe;
- celulele pot apărea singure sau în perechi, adesea sub formă de „V”, asemănătoare cu literele chinezești;
- imobile;
- asporulate

Granulele metacromatice apar în regiunile polare atunci când tulpina este cultivată în medii de îmbogățire, cum ar fi mediul Loeffler și sunt vizibile când sunt colorate cu albastru de metilenă.

Diagnosticul de difterie nu trebuie să se bazeze exclusiv pe microscopia directă a unui frotiu.

6.6. IDENTIFICAREA BIOCHIMICĂ

Identificarea speciilor prin testele convenționale simple recomandate cuprinde o serie de carbohidrați și reacții enzimatică pentru identificarea fenotipică a corinebacteriilor (Tabelul 1). Izolatele sunt catalazo- pozitive.

Tabelul 1. Teste biochimice convenționale

Test	Mediu de testare
Reducerea nitraților	Bulion cu nitrați
Hidroliza ureei	Uree în pantă
Producerea de catalază	Peroxid de hidrogen
Prezența cistinazei	Agar Tinsdale
Prezența pirazinamidazei	Test comercial
Fermentarea carbohidraților	Glucoză, zaharoză, maltoză, amidon

Testele pentru activitatea pirazinamidazei și producerea de cistinază sunt teste de screening utile pentru a diferenția cele trei specii potențial toxigene de alte corinebacterii. Dacă testele de screening nu sunt disponibile, ar putea fi utilizate metodele biochimice convenționale, iar mediile pot fi preparate local dacă sunt disponibili reactivii (Tabelul 2). Acolo unde este posibil, testarea toxigenității tulpinilor trebuie inițiată fără întârziere.

Tabelul 2. Teste biochimice pentru identificarea speciilor patogene de *Corynebacterium*

Microorganism	CYS	PYZ	FA	Nitrat, reducerea	Ureaza	Producerea acidului din:					Lichefierea gelatinei
						Gluc	Riboză	Maltoză	Zaharoză	Amidon	
<i>C. diphtheriae</i> biovar <i>gravis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	N/A
biovar <i>mitis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	N/A
biovar <i>intermedius</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	N/A
biovar <i>belfanti</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	N/A
<i>C. ulcerans</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+ la 25 °C
<i>C. pseudotubercu losis</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	- la 25 °C

Notă: CYS – cistinaza, PYZ – pirazinamidaza, Gluc – glucoza, FA - fosfataza alcalină, N/A – neaplicabil.

În plus, sunt disponibile mai multe teste/sisteme pentru identificarea agenților patogeni bacterieni, de la kituri disponibile comercial până la teste/sisteme mai complexe, automatizate. Aceste sisteme oferă rezultate precise și mai rapide și sunt ușor de utilizat în practica de rutină.

Sistemul de testare API-Coryne

Sistemul API-Coryne facilitează identificarea, timp de 24 de ore, a *Corynebacterium jeikeium* (descrisă inițial în 1976 ca o bacterie corineformă foarte rezistentă, care a cauzat sepsis sever la pacienții cu afecțiuni hematologice maligne și neutropenie profundă) și alte corynebacterii importante din punct de vedere medical. Testul conține 20 de microtuburi cu substraturi deshidratate pentru detectarea activității a 11 enzime și fermentarea a opt carbohidrați (Fig. 7).

Positive tests



Negative tests



Figura 7. Sistemul de testare API-Coryne. Testul de sus ilustrează rezultate pozitive, testul de jos – rezultat negativ (nicio schimbare de culoare).

Pentru controlul calității sistemului de testare API-Coryne, de consultat prospectul referitor la instrucțiunile recomandate.

6.7. RAPORTAREA DATELOR DE LABORATOR

În funcție de resursele laboratorului, timpul minim luat de la selectarea coloniilor de pe mediile selective și determinarea toxigenității este de obicei de 24-48 de ore. Cel mai utilizat test pentru detectarea toxigenității este testul Elek, iar rezultatele sunt disponibile în 24 de ore. Prin urmare, împreună cu un sistem de testare rapidă bazat, de exemplu, pe PCR, rezultatele de confirmare trebuie să fie disponibile în 24 de ore.

Odată ce coloniile suspecte au fost confirmate ca și corineforme prin colorație Gram, ele sunt subcultivate pe medii de sânge neinhibitoare pentru testele de screening, biotipare și testarea toxigenității (de obicei în laboratoare de referință) și, dacă este necesar, studierea microscopică a morfologiei în preparat colorat cu albastru de metilen Loeffler sau tehnica Albert.

Criteriile minime de laborator necesare pentru a confirma prezumtiv un izolat ca *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* sau *C. pseudotuberculosis* sunt următoarele:

- catalazo-pozitiv;
- ureazo-negativ pentru *C. diphtheriae*, ureazo-pozitiv pentru *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*;
- reducerea nitraților la nitriți (cu excepția biovarului *belfanti*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*);
- nu hidrolizează pirazinamida;
- produce cistinază;
- fermentează glucoza, riboza și maltoza, biovarul *gravis* și *C. ulcerans* fermentează și glicogenul/amidonul.

De la apariția PCR, s-a demonstrat că unele tulpini non-toxigene găzduiesc gena care codifică toxina, *tox*, fără a exprima toxina difterică (non-toxigenă, purtătoare de genă ce codifică toxina; NTTB). Aceste tulpini au fost raportate în Federația Rusă, Lituania, Canada și Franța. Izolatele toxigene care poartă bacteriofagi ce transportă *tox*, pot transforma tulpinile de *C. diphtheriae* netoxigene, avirulente în tulpini toxigene, foarte virulente. Deși nu sunt incluse în definițiile de caz din Europa, SUA și OMS, țările ar trebui să înregistreze incidența corinebacteriilor netoxigene, în special a NTTB, în cadrul supravegherii difteriei.

7.1. METODOLOGIA DE DETECTARE A TOXINEI DIFTERICE: TESTUL ELEK

Odată ce un microorganism este identificat biochimic ca posibil *C. diphtheriae* sau *C. ulcerans*, izolatul trebuie testat pentru capacitatea de a produce toxina difterică. Există mai multe metode *in vitro* disponibile, dar acestea depind de disponibilitatea resurselor și de experiența personalului de laborator. Cea mai utilizată metodă pentru determinarea toxigenității este testul Elek (reacția de imunoprecipitare), care a fost îmbunătățit prin utilizarea unui mediu Elek superior, îmbunătățind considerabil calitatea și acuratețea testului. Acest test a fost ulterior modificat pentru a obține rezultate rapide (16-24 ore) folosind doar câteva colonii din placa de izolare primară și volume reduse de medii specifice.

Tulpini de control și alte recomandări de calitate

Pentru a contribui la standardizarea metodologiei de testare a toxigenității corinebacteriilor sunt recomandate trei tulpini de referință/control:

Pozitiv = *C. diphtheriae* biovar *gravis*, toxigenic, NCTC 10648

Slab pozitiv = *C. diphtheriae* biovar *gravis*, toxigenic, NCTC 3984/ATCC 19409

Negativ = *C. diphtheriae* biovar *belfanti* non-toxigenic, NCTC 10356

Mediu de bază: Mediul Elek este cel mai potrivit pentru efectuarea acestui test. Mediul trebuie să fie maxim transparent pentru a vizualiza chiar și liniile slabe de precipitare. Loturile noi de mediu trebuie testate înainte de utilizare.

Serul: serul de bovine este cel mai recomandat pentru testul dat (cu condiția să nu conțină toxine difterice). Serul ecvin trebuie evitat, deoarece acesta poate produce reacții încrucișate cu aceeași antitoxină derivată de la gazdă. Fiecare lot de ser trebuie verificat și poate fi dis-

tribuit în cantități de 3 ml în tuburi din sticlă cu capac care se păstrează la -20°C . Serurile depozitate în acest fel pot rămâne stabile până la un an.

Antitoxina: antitoxina este disponibilă doar din câteva surse din întreaga lume și anume India, Federația Rusă, Indonezia, Brazilia.

Pentru efectuarea testului Elek modificat este necesar de 3 ml de mediu Elek într-o placă Petri cu diametrul de 4,5 cm, antitoxină diferită în concentrație de 10 UI/disc și inoculul plasat abundent la 9 mm de marginea discului cu antitoxină.

Grosimea (volumul) mediului este un factor critic în creșterea vitezei și a sensibilității de detectare a toxigenității în testul Elek modificat, iar o reducere a volumului de mediu a îmbunătățit ambii parametri. Utilizarea a 3 ml de mediu Elek a redus timpul necesar pentru apariția liniilor de imunoprecipitare (liniile de precipitare fiind clar vizibile după 16 ore de incubare la 37°C) și, în plus, a crescut claritatea și vizibilitatea liniilor. Volumele mai mici de 3 ml nu au fost suficiente pentru a asigura acoperirea plăcii.

Atât densitatea, cât și distanța inoculului de la discul cu antitoxină s-au dovedit a fi factori importanți în viteza de detectare a toxigenității. Liniile de imunoprecipitare au fost mai clare și produse mai rapid atunci când a fost folosit inocul din abundență.

Rezultatele mai multor studii au constatat că distanța optimă dintre inocul și discul cu antitoxină este de 9 mm.

Interpretarea rezultatelor:

Tulpină toxigenă: Apariția liniilor albe de precipitare, care încep la aproximativ 10 mm de la discul cu antitoxină și la un unghi de aproximativ 45° față de linia de creștere. Dacă tulpina de testat prezintă linii similare cu martorul pozitiv pentru toxină, atunci tulpina este considerată ca fiind toxigenă.

Tulpină non-toxigenă: lipsa liniilor de precipitare.

Notă: Liniile secundare de precipitare datorate antigenelor solubile, altele decât toxina diferită, pot fi produse atât de tulpini toxigene, cât și de tulpini netoxigene.

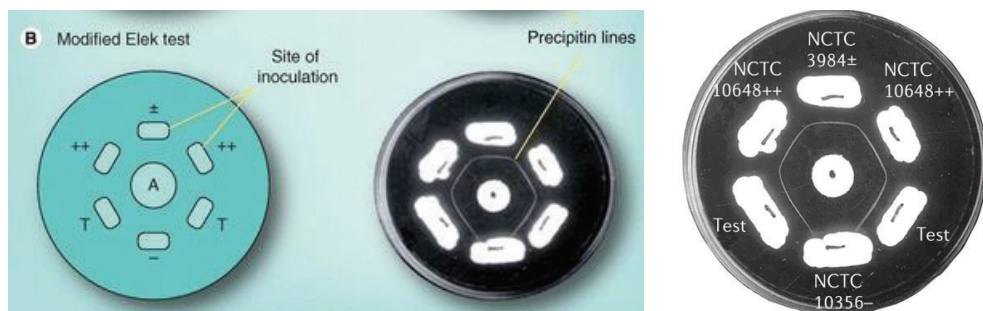


Figura 8. Testul Elek modificat

Materiale de referință

Tulpinile de referință ale speciilor de *Corynebacterium* recomandate pentru testele fenotipice sunt cele utilizate în Marea Britanie și pot fi obținute din Colecția Națională de Culturi Tip (NCTC).

Pentru un laborator de referință specializat în diagnosticarea difteriei, se recomandă ca tulpinile martor să fie subcultivate la fiecare șapte zile și păstrate la 6-8 °C.

Stocurile de control, precum și alte culturi de *C. diphtheriae* potențial toxigene sunt menținute în bulion cu glicerol 16% (v/v) și depozitate la -20 °C sau -70 °C.

Sistemele automate de identificare au crescut foarte mult viteza și acuratețea identificării speciilor de *Corynebacterium*, permițând astfel inițierea rapidă și fiabilă a terapiei eficiente și a răspunsului din partea serviciului de sănătate publică, inclusiv măsuri de protecție pentru lucrătorii din domeniul sănătății. Mai jos sunt descrise unele sisteme automate:

- MALDI-TOF MS
- VITEK 2
- Sistem BD Phoenix
- Sistem de identificare microbiană MicroSeq

Pentru toate sistemele, instrucțiunile producătorului trebuie respectate cu strictețe pentru pregătirea probelor, performanța testelor și interpretarea rezultatelor/scorurilor. Controlul calității și întreținerea instrumentelor trebuie urmate așa cum este stipulat în manualele de utilizare.

Au fost dezvoltate diferite sisteme MALDI-TOF MS pentru identificarea microbiană, inclusiv:

- MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germania)
- VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Franța)
- Sistem Andromas (Andromas SAS, Paris, Franța)

Aceste sisteme de identificare diferă în principal prin procedurile de pregătire a probelor, acoperirea speciilor din bazele de date de referință și algoritmul de identificare al software-ului.

Au fost descrise diferite metode de preparare a probelor, cum ar fi transferul direct de colonie, transferul direct de colonie după tratamentul cu acid formic și extracția în tub cu etanol-acid formic.

MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS este o nouă tehnologie de identificare a speciilor bazată pe compoziția proteică a celulelor microbiene, care înlocuiește metodele fenotipice convenționale. Datorită capacității de a identifica rapid o gamă largă de bacterii și micete, și a rentabilității acestora (excluzând costul instrumentului MALDI-TOF), acesta devine un instrument de laborator tot mai utilizat pentru identificarea speciilor.

MALDI-TOF Biotyper și VITEK MS

Dintre instrumentele disponibile, cele două sisteme bazate pe MS, mai frecvent utilizate sunt MALDI-TOF Biotyper și VITEK MS. Metoda permite identificarea rapidă și fiabilă a cori-

nebacteriilor relevante clinic și potențial toxice, cu condiția să fie disponibilă o bază de date controlată și de calitate a spectrelor de referință.

Cu toate acestea, toate metodele de mai sus confirmă doar speciile bacteriene și nu producerea toxinei difterice. Există studii limitate care au evaluat utilizarea acestui instrument pentru identificarea speciilor de *Corynebacterium*, iar aceste studii au fost efectuate în special folosind sistemul MALDI-TOF Biotyper și nu VITEK MS. MALDI-TOF nu poate diferenția *C. diphtheriae*, sensu stricto, de *C. belfanti* sau *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*.

Ambele sisteme pot identifica cu succes la nivel de specie izolatele clinice de *Corynebacterium*, dar în parte au și unele dezavantaje. Utilizând MALDI-TOF Biotyper nu putem fi siguri pe diferențierea între speciile de *Corynebacterium* care provoacă infecții ale tractului urinar și eritasmă, însă aceasta este posibil la utilizarea sistemului VITEK MS. În timp ce VITEK MS nu poate face diferențierea dintre *C. amycolatum* și *C. xerosis*, care poate fi diferențiat cert utilizând MALDI-TOF Biotyper, ambele sisteme au dificultăți la identificarea *C. afermentans*. Aceste scenarii trebuie luate în considerare atunci când se utilizează astfel de tehnologii la identificarea microorganismelor în laboratorul de referință.

Aceste sisteme nu pot face diferența între biovarurile de *C. diphtheriae*. Deși sistemele au unele limitări, ele pot fi încă utilizate în laboratoarele clinice pentru a detecta speciile de *Corynebacterium* semnificative din punct de vedere clinic, fapt ce ar permite un tratament rapid și adecvat al infecției.

Actualizarea continuă a bazelor de date va crește și mai mult utilitatea acestor sisteme rapide în identificarea acestor specii, dar în unele cazuri nu la nivel de biovar.

Măsurarea și interpretarea rezultatelor MALDI-TOF MS

Producătorii recomandă un scor cu anumite valori limită a spectrului pentru MALDI-TOF Biotyper.

Cel mai popular sistem MALDI-TOF pentru identificarea *Corynebacterium* spp. utilizează scorul de $\geq 2,0$ pentru identificarea la nivel de specie și $\geq 1,7$ pentru identificarea la nivel de gen. Scorurile sub 1,7 sunt considerate nesigure.

Valorile rezultate (scor):

- Peste 2,0 pentru o identificare fiabilă la nivel de specie;
- Între 1,7 și 2,0 pentru nivel de gen;
- Sub 1,7 nu poate fi evaluat ca valid conform instrucțiunilor producătorului.

VITEK 2

VITEK 2 (bioMérieux) este un sistem automatizat ce utilizează tehnologia bazată pe creșterea. Sistemul utilizează carduri de reactivi colorimetrici (ANC) care sunt inoculate, incubate și interpretate automat. Cardul ANC ajută la identificarea bacteriilor anaerobe și a speciilor de *Corynebacterium* prin utilizarea a 64 de godeuri cu medii deshidratate care conțin subs-

traturi cromogene. Softul sistemului include doar opt specii de *Corynebacterium*. Raportul de laborator generat include informații despre nivelul de identificare a speciilor și poate conține teste suplimentare recomandate pentru a identifica izolatele greu diferențiable. Evaluările multicentre ale cardului VITEK 2 ANC au arătat 95,1% identificare corectă, 4,9% identificare scăzută, 4,6% identificare incorectă și 0,3% izolate neidentificate.

Sistemul BD Phoenix

Sistemul BD Phoenix (Becton, Dickinson and Company, NJ, SUA) este un sistem automatizat pentru identificarea rapidă și testarea sensibilității la antimicrobiene (AST) a bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Similar cu VITEK 2, sistemul Phoenix utilizează, de asemenea, reacții colorimetrice și fluorimetrice și conține panouri de substraturi biochimice uscate. Baza de date de identificare a sistemului BD Phoenix conține 15 specii de *Corynebacterium*.

Sistem de identificare microbiană MicroSEQ

Sistemul de identificare microbiană MicroSEQ (Applied Biosystems) este un sistem de identificare genotipică bazat pe secvențierea ADN comparativă a regiunii 16S. Sistemul identifică bacteriile în <24 de ore și oferă opțiunea de identificare bacteriană de rutină folosind primele 527 bp ale ADN sau identificarea cu rezoluție mai mare bazată pe întreaga regiune de 1500 bp. Biblioteca MicroSEQ conține 50 de specii de *Corynebacterium*.

Raportarea datelor de laborator

La izolarea unei tulpini toxigene de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* sau *C. pseudotuberculosis* de la pacient, trebuie informați imediat:

- clinicianul responsabil de caz – telefonic;
- epidemiologul din cadrul instituției.

Ulterior, cazul trebuie notificat oficial la Agenția Națională Pentru Sănătate Publică, în conformitate cu sistemul național de notificare pentru difterie.

PCR pentru detectarea genei toxinei difterice

De la începutul anilor 1990, PCR convențional a fost utilizat pentru a detecta gena toxinei difterice (tox), în special porțiunea activă biologic (Fragmentul A). În plus, proiectarea primerilor cu specificitate pentru diferite regiuni ale acestei gene a fost dezvoltată cu succes și descrisă în detaliu în literatură. Mai mult, au fost dezvoltate protocoale pentru detectarea prin PCR a toxinei direct din materialul clinic.

Odată cu dezvoltarea PCR în timp real (RT-PCR), au fost create protocoale care permit o detectare mai rapidă a toxinelor decât PCR convențional, fără a mai fi nevoie de electroforeză pe gel și pași de detectare UV. Mai mult, această metodă anulează necesitatea colorării cu bromură de etidiu toxică. Odată ce ADN-ul este extras din probe sau izolat adecvat și Master-Mix-ul este gata pregătit, rezultatele PCR sunt disponibile în 60–90 de minute. Prima reacție PCR în timp real pentru detectarea toxinei a fost publicată în 2002 (Mothershed et al., 2002). PCR în timp real a arătat o sensibilitate crescută pentru detectarea toxicității față de protocoalele descrise anterior prin PCR convențional.

Apariția tulpinilor de *C. ulcerans* toxigene la pacienții cu boală asemănătoare difteriei au determinat Sing și colaboratorii lui pentru a secvenția toxina de la *C. diphtheriae* și *C. ulcerans*. Astfel, dezvăluind diferențe între secvențele toxinei ale acestor două specii (Sing și colab., 2003). Ca rezultat, PCR în timp real Mothershed nu a detectat în mod fiabil tox la unele tulpini de *C. ulcerans* (Cassiday et al., 2008), ceea ce a condus pe alții să proiecteze primeri PCR, precum și sonde de hibridizare din regiunile genei tox, care au fost prezentate să fie conservate la nivel de secvență atât de la *C. diphtheriae*, cât și de la *C. ulcerans* (Sing și colab., 2011; Badell și colab., 2019; Schuegger și colab., 2008) (Anexa 9). Zoysa et al. (2016) au dezvoltat și validat o reacție PCR în timp real cvadruplex pentru corinebacterii, care a fost utilizată la UKHSA din 2014 (De Zoysa și colab., 2016).

Acest test îmbunătățește PCR în timp real prin includerea unei gene de codificare a subunității β a ARN polimerazei (rpoB) pentru a viza în mod specific *C. diphtheriae*, a doua țintă – rpoB pentru *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* și a treia țintă identifică fragmentul A al toxinei de la oricare dintre cele trei specii. Această metodă include și un control intern al procesului și a fost optimizată pentru amplificatorul Qiagen Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germania) (Anexa A9.3.3 și Tabelul A9).

Alte teste multiplex au fost, de asemenea, descrise pentru identificarea moleculară a *C. diphtheriae* și *C. ulcerans* toxigen și non-toxigen folosind tox, rpoB și dtxR ca ținte ale genelor (Mancini et al., 2012; Badell et al., 2019; Pimenta et al., 2008). Mai recent, un test triplex a fost descris de Williams și colaboratorii lui.

PCR în contextul investigației unui focar

Datorită dificultății de a obține medii și reactivi specializați necesari testului Elek, PCR pentru gena *tox* este o alternativă de diagnosticare rapidă, dar trebuie utilizată împreună cu un test fenotipic pentru exprimarea toxinelor (vezi și Standardele de supraveghere ale OMS) (World Health Organization, 2018).

O modalitate de a conserva reactivii necesari pentru testarea Elek este de a folosi PCR pentru a „tria” tulpinile și de a testa numai izolatele pozitive PCR *tox* prin testul Elek pentru a confirma producția de toxină difterică. Cu toate acestea, trebuie subliniat faptul că, deși detectarea PCR a toxinei dintr-un eșantion clinic oferă dovezi susținătoare pentru diagnosticarea difteriei, unele izolate detectate în timpul unui focar de difterie în Federația Rusă și Ucraina erau purtătoare de genă ce codifică toxina, nefiind exprimată (NTTB). Astfel de izolate sunt non-toxigenice prin Elek sau alte teste fenotipice. Din cauza că *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* sunt, de asemenea, capabile să adăpostească *tox*, detectarea prin PCR a genei *tox* nu va identifica microorganismul prezent. În schimb, un rezultat negativ al PCR de toxicitate este util pentru a exclude rapid toxigenitatea și pentru a preveni măsurile de control inutile.

Tipizarea epidemiologică a bacteriilor patogene va ajuta la o mai bună înțelegere a dinamicii transmiterii patogenului în timpul unei situații de focar. MLST (Multilocus sequence typing) este avantajos față de alte metode precum ribotiparea și PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) în ceea ce privește simplitatea și portabilitatea. MLST investighează diversitatea genetică prin analizarea variației nucleotidelor (polimorfismul unei singure nucleotide [SNP]) în cadrul celor șapte sau mai multe gene de întreținere, oferind astfel date eficiente și de înaltă rezoluție, potrivite pentru studiile epidemiologice și pentru supraveghere. MLST permite analiza tipurilor de secvențe și a complexelor clonale ale organismului și ajută la înțelegerea unei clone specifice care se răspândește pe scară largă în regiune sau în timpul focarului.

MLST

Schema *C. diphtheriae* MLST a fost dezvoltată de Bolt și colaboratorii lui (2010). În metoda dată se utilizează informațiile despre secvența de nucleotide din fragmentele interne ale următoarelor șapte gene:

- Lanț alfa ATP sintetazei (atpA)
- Subunitatea alfa ADN polimeraza III (dnaE)
- Proteina Chaperonă (dnaK)
- Factorul de alungire G (fusA)
- 2-izopropilmalat sintază (leuA)
- Componentele 2-oxoglutarat dehidrogenază E1 și E2 (odhA)
- Lanțul beta ARN polimerazei direcționate de ADN (rpoB)

Detaliile schemei MLST pentru *C. diphtheriae* sunt disponibile în baza de date PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/corynebacterium-diphtheriae>) și Anexa 10.

Se extrage ADN-ul genomic, apoi fiecare alelă este amplificată prin PCR folosind primerii descriși în tabelul din anexa A15, iar ampliconii rezultați sunt vizualizați și verificați pentru puritate prin electroforeză pe un gel de agaroză. Fragmentele de ADN a șapte gene de întreținere, amplificate prin PCR, sunt purificate, iar fragmentele de ADN de pe fiecare catenă sunt secvențiate de ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SUA) folosind primerii de secvențiere ai trusei de secvențiere a ciclului ABI PRISM® BigDye Terminator (Applied Biosystems, SUA). Profilurile alelelor, ST și complexe clonale sunt luate din baza de date PubMLST (https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst_cdiphtheriae_seqdef). Alelele și ST-urile care nu au fost descrise anterior ar trebui să fie încărcate în Baza de date. În plus, analiza goeBURST poate fi făcută pentru o studiere detaliată a structurii populației (<http://www.phyloviz.net>).

MLST de *C. ulcerans*

Deoarece *C. ulcerans* toxigen are posibilitatea de a provoca difteria, o schemă MLST separată pentru *C. ulcerans* a fost descrisă de König și colegii săi.

Primerii pentru *atpA*, *dnaA*, *fusA*, *odhA* și *rpoB* sunt identici cu *C. diphtheriae*, (Bolt și colab., 2010). Primerii utilizați pentru *dnaK* și *leuA* au fost adaptați la *C. ulcerans* în conformitate cu genomul lui *C. ulcerans* 809. Amplificarea și secvențierea pentru analiza MLST sunt realizate pe baza schemei publicate pentru *C. diphtheriae* cu modificări minore. Fiecare PCR este efectuat într-un volum total de 50 μl utilizând kitul HotStarTaq® Master Mix (Qiagen).

Analiza goeBURST

Analiza cluster a izolatelor poate fi efectuată folosind software-ul PHYLOViZ 1.1, disponibil gratuit la <http://www.phyloviz.net>. Metodele oferă rezultate reproductibile și comparabile necesare pentru o analiză a populației bacteriene la scară globală, în plus față de utilitatea lor pentru anchetele epidemiologice locale. Software-ul este disponibil ca aplicație JAVA desktop și, de asemenea, ca aplicație online. Instrumentul permite analiza metodelor de tipare bazate pe secvențe care generează profiluri alelice și datelor epidemiologice asociate acestora. Rezultatele pot fi afișate ca un grafic adnotat care se suprapune cu rezultatele interogării oricăror alte date epidemiologice disponibile. PHYLOViZ folosește algoritmul goeBURST, o modificare a algoritmului eBURST publicată anterior de Feil și colab., 2004.

Analiza variantei de locus

În ultimii ani, utilizarea variației secvenței de nucleotide la mai mulți loci de întreținere a devenit din ce în ce mai populară pentru caracterizarea tulpinilor, deoarece are avantaje pentru deducerea nivelurilor de relație între tulpini și reconstrucția evenimentelor evolutive.

În ceea ce privește MLST, descendenții genotipului fondator vor rămâne inițial neschimbați în profilul alelic, dar în timp vor apărea variante în care una dintre cele șapte alele s-a schimbat (prin mutație punctuală sau recombinare). Aceste genotipuri, care au profiluri alelice ce diferă de cel al fondatorului doar la unul dintre cei șapte loci MLST, sunt numite variante cu un singur locus (SLV). În cele din urmă, SLV-urile se vor diversifica și mai mult pentru a produce variante care diferă la doi dintre cei șapte loci (variante cu locus dublu [DLV]), la trei dintre loci (variante cu triplu locus [TLV]) și așa mai departe. Exemple de aceste variante sunt prezentate în Tabelul 3.

Există rapoarte din ce în ce mai multe despre ST noi în regiunile cu difterie endemică. Analiza SNP a arătat că aceste ST noi sunt SLV sau DLV ale ST-urilor existente, ceea ce indică faptul că această metodă de analiză ne-ar putea ajuta să înțelegem evoluția noilor clone și răspândirea clonelor existente.

Tabelul 3. Exemplet de analiză a variantei cu un locus, dublu și triplu cu 7 loci MLST pentru *C. Diphtheriae*

Strain	atpA	dnaE	dnaK	fusA	leuA	odhA	rpoB	ST	
1	2	10	3	1	7	3	2	ST301	
2	2	10	3	1	3	3	2	ST574	Variante cu un singur locus (SLV) din ST301
3	4	10	3	1	7	3	13	ST469	Variante cu dublu loci din ST301
4	2	4	4	1	3	3	5	ST5	Variante cu triplu loci din ST301

Secvențierea genelor pentru identificarea speciilor de *Corynebacterium*

Până în prezent, genul *Corynebacterium* este format din mai mult de 115 specii izolate din mostre umane și probe de mediu (<https://lpsn.dsmz.de/genus/corynebacterium> accesat la data de 6 mai 2020). Prin acest grup foarte divers se găsesc atât agenți patogeni virulenți, cât și comensali inofensivi. Prin urmare, în diagnosticul clinic, este necesar să se aleagă o metodă fiabilă și rapidă pentru determinarea cu precizie a speciei. Secvențierea genelor ribozomale (16S sau 23S) este un instrument bun pentru determinarea majorității acestor specii.

Cu toate acestea, utilizatorii trebuie să fie conștienți de faptul că unele *Corynebacterium* spp. nu pot fi detectate numai prin această metodă. Acestea includ: *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*; *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* și *C. ureicelerivorans*; *C. aurimucosum*, *C. minutissimum* și *C. singulare*; *C. sundsvallense* și *C. thomsseni*; *C. propinquum* și *C. pseudodiphtheriticum* (<2%); *C. xerosis*, *C. freneyi* și *C. hansenii*; *C. macginleyi* și *C. accolens*. Rezolvarea acestei probleme se poate face prin secvențierea genei **rpoB**. Din păcate, genele **ARNr** 16S ale corinebacteriilor prezintă foarte puțin polimorfism; prin urmare, este necesară secvențierea genei complete 16S (aproximativ 1500 bp).

Progrese noi în genomică și proteomică

Aplicarea tehnologiilor NGS a oferit perspective detaliate despre genomica corinebacteriilor și o mai bună înțelegere a modului și cauzelor apariției sau dispariției clonelor epidemice și contribuie la prevenirea și gestionarea acestor infecții devastatoare.

NGS este din ce în ce mai utilizat pentru a explora focarele și dinamica transmiterii acestor microorganisme. Secvențierea genomică oferă o oportunitate unică de a explora deriva evolutivă a acestor organisme și ar trebui să elucideze diversitatea inserției bacteriofagelor și a factorilor de virulență asociați. Datele genomice ale tulpinilor de *C. diphtheriae* au de-

monstrat că majoritatea acestor ținte erau potrivite pentru evaluare ulterioară, prezentând între 2 și 16 variante. Prin urmare, metodele de tipare bazate pe secvențiere, pe lângă faptul că sunt foarte reproductibile, pot fi utilizate și pentru a explora relațiile evolutive care stau la baza epidemiologiei.

WGS

În general, variația între genomii bacterieni ai aceleiași specii apare din diferite motive, inclusiv mutații punctuale, recombinare omoloagă și diferențe în conținutul genomului. Mutațiile punctuale cuprind SNP-uri și inserții sau deleții de un singur nucleotid, care pot varia mult în funcție de specie. SNP-urile sunt cea mai comună și mai simplă formă de variație a ADN-ului și sunt un motor important al evoluției și expansiunii bacteriene.

SNP-urile sunt cele mai frecvente tipuri de variație care apar. Aceasta este variația unei singure nucleotide (adenină, citozină, guanină sau timidină) într-o secvență genomică și poate duce la modificări subtile în genom. Acumularea lor are ca rezultat majorarea diversității între genom. Datorită degenerării codului de aminoacizi, majoritatea SNP-urilor sunt mutații sinonime („silenți”) și nu duc la o schimbare a funcționalității expresiei genei, iar mutațiile non-sinonime duc la o schimbare a aminoacidului și, prin urmare, pot modifica expresia genei sau a proteinei. Raportul dintre numărul de modificări de nucleotide non-sinonime per situs non-sinonim (dN) și numărul de modificări sinonime per situs sinonim (dS) este adesea folosit pentru a determina rata de evoluție în sau între organisme. Prin urmare, SNP-urile pot fi utilizate ca un semnal stabil pentru diseminarea unei anumite tulpini. Această utilizare este extinsă la genetica populației pentru estimarea variației genetice, identificarea rudenței sau filiației, măsurarea structurii populației și a modificărilor în dimensiunea populației în timp.

Recent, WGS a permis dezvoltarea unei scheme de tipizare cunoscută sub numele de MLST al genomului de bază (cgMLST). Aceasta este utilizată în prezent în mai multe spitale de investigare a focarelor pentru a descifra informații despre legătura dintre izolate prin filogenie bazată pe SNP. Metoda demonstrează o bună capacitate de testare prin extinderea conceptului tradițional MLST la întregul genom. Acest lucru oferă informații suplimentare cu rezoluție mai mare despre diversitatea genetică a speciei și evidențiază faptul că cgMLST poate deveni standardul de aur pentru subtipizarea tulpinilor în investigațiile epidemiologice. În plus, analiza pangenomului a arătat o mai bună inteligibilitate în cadrul tulpinilor în comparație cu analiza separată a genomului de bază sau accesoriu al speciei, datorită naturii care se schimbă adesea a genomului accesoriu. Pangenomul reprezintă toate genele, indiferent dacă sunt constante sau variabile care se găsesc la membrii unei specii. Mai multe studii subliniază utilitatea WGS în înțelegerea evoluției și patogenității diferitelor tulpini de *C. diphtheriae*.

Transcriptomica

Abordarea genomică identifică secvența ADN a unui anumit microorganism, deși această cunoaștere singură nu definește funcția genei la stimulii externi. Genele nu sunt active tot timpul și sunt exprimate atunci când este necesar pentru a acționa în procesele biologice celulare. Setul de gene care sunt exprimate într-o celulă și o anumită condiție fiziologică sau stadiu de dezvoltare la un moment dat se numește transcriptom. Studiile transcriptomului urmăresc să analizeze colecția tuturor transcriptelor și să ofere informații despre reglarea genelor și pot fi utilizate pentru a deduce funcțiile genelor necaracterizate. Una dintre aplicațiile acestei abordări este de a oferi informații despre răspunsul de apărare al gazdei la supraviețuirea și proliferarea agenților patogeni bacterieni. Aplicarea diversă a transcriptomicii include microcipuri și secvențierea ARN.

Deși genomul *C. diphtheriae* a fost secvențiat cu mai bine de un deceniu în urmă, nu se știe multe despre transcriptomul său. Secvențierea ARN este considerată un instrument ideal pentru analiza transcriptomelor complete și este aplicată în explorarea profilului de expresie și caracterizarea genelor exprimate diferențial. Astfel, reprezintă un instrument important pentru a descoperi mecanismele de virulență și patogenitate ale microorganismelor.

Secvențierea ARN a *C. diphtheriae* a investigat modificarea profilului de transcripție între o tulpină de tip sălbatic și un mutant $\Delta dtxR$ și de asemenea a detectat structurile operonului din datele transcriptomului tulpinii de tip sălbatic. Aproximativ 15% din genom a fost transcris diferențiat, iar descoperirile sugerează că *dtxR* poate juca un rol și în alte funcții de reglare, pe lângă reglarea metabolismului fierului și toxinei diferite.

Testul ELISA (imunoenzimatic)

Etapele generale ale reacției imunoenzimatică indirecte în faza solidă pentru cuantificarea anticorpilor anti-toxinei difterice în ser sunt universale, indiferent dacă testul este efectuat folosind un kit comercial sau un test intern:

1. Etapa de acoperire: se folosește un toxoid difteric cu o concentrație cunoscută de 1/100 pentru a acoperi suprafața godeurilor plăcii de microtitrare cu incubarea la 37 °C timp de o oră sau la 4 °C peste noapte. Din motive practice și de siguranță toxoidul este întotdeauna preferat ca toxină antigenică de acoperire. Cu toate acestea, preparatele toxoide difterice pot afecta rezultatele. În cazul truselor comerciale, placa este de obicei deja pre-acoperită cu antigen.
2. La a doua etapă va fi utilizat un tampon de spălare pentru a elimina excesul de antigen de acoperire. Procedura de spălare este o etapă critică și necesită o atenție deosebită. Spălarea necorespunzătoare a plăcii va da rezultate inexacte, cu precizie slabă și fundaluri ridicate sau scăzute a sensibilității.
3. Etapa de blocare: o soluție concentrată care nu interacționează cu proteinele, cum ar fi albumina serică bovină (BSA) este adăugată în toate godeurile plăcii ca agent de blocare. Temperatura și timpul de incubație poate fi similar cu cel al etapei de acoperire.
4. Placa va fi din nou supusă spălării cu soluția tampon pentru a elimina excesul de soluție de blocare.
5. Probele de ser cu concentrație necunoscută de anticorpi, de obicei diluate 1/100 în tampon de diluție comun, sunt apoi adăugate în godeuri. Este pregătită o curbă de calibrare de referință a serului uman pentru anti-toxina difterică, fiind calibrată în UI (unități internaționale). Controalele pozitive și negative trebuie să fie prezente pentru fiecare ședință petrecută. În general, placa este incubată la 37 °C timp de o oră sau la 4 °C peste noapte.
6. Placa va fi din nou spălată și se va adăuga un conjugat anti IgM/IgG uman marcat cu peroxidază, ca anticorp de detectare, în toate godeurile plăcii apoi incubat conform instrucțiunilor.
7. Iarăși va fi repetată spălarea cu soluția tampon pentru a îndepărta excesul de conjugat enzimă-anticorp care au rămas necuplate, apoi va fi adăugat substratul de peroxidază ce va fi convertită de enzimă pentru a produce semnalul cromogen. Reacția se desfășoară de obicei la întuneric și la temperatura camerei.
8. Reacția imunoenzimatică este apoi oprită și densitatea optică a fiecărui godeu este măsurată cu ajutorul unui cititor de microplăci (spectrofotometru) la o lungime de undă specifică produsului de reacție.

9. Rezultatele sunt cuantificate comparând semnalul cromogen al probei de ser cu serul standard de referință. Titrurile sunt exprimate în UI/ml. Pentru ca rezultatele să fie valide este necesară curba de calibrare, câte un control pozitiv și negativ pentru fiecare placă și trebuie să fie un interval stabilit în timpul validării metodei sau pe certificatul de calitate (QC).

Detaliile reactivilor utilizați în testele ELISA comerciale nu sunt furnizate întotdeauna de către producător. Diferențele dintre reactivi generează caracteristici diferite de performanță ale truselor.

În conformitate cu articolul 1 paragraful 2b al Directivei Europene 98/79/CE, utilizarea dispozitivelor medicale de diagnostic *in vitro* sunt destinate de către producător pentru a asigura calitatea, performanța și siguranța produsului. Prin urmare, procedura de testare, precauțiile și avertismentele din instrucțiunile de utilizare trebuie respectate cu strictețe. Utilizarea testkit-urilor cu analizoarele și echipamentele similar trebuie să fie validate. Orice modificare a designului, compoziției și procedurii de testare, precum și pentru oricare utilizare în combinație cu alte produse neaprobate de producător nu este autorizată.

Echipe și consumabile necesare

- Cititor pentru microplăci, echipate pentru măsurare, cu posibilitate de alegere a diferitor valori a absorbanței, întocmai cu cerințele instrucțiunilor;
- Incubator cu temperatura reglabilă de 37 °C;
- Spălător cu dispozitive corespunzătoare și capabile să distribuie volume aproximativ 300 μl (fluide de spălare);
- Dispozitive de pipetare calibrate corespunzător și capabile să distribuie volumul necesar de 10-1000 μl (probe și reactivi);
- Vortex;
- Apă distilată;
- Tuburi de unică folosință;
- Cronometru;
- Imprimantă;
- Congelator la -20 °C;
- Frigider la 2-8 °C;
- Vârfuri de unică folosință pentru dozatoare cu volum de 200 μl și 1000 μl;
- Mănuși de protecție de unică folosință;
- Vas pentru deșeuri biologice cu soluție de dezinfectant;
- Suport pentru microeprubete cu volumul de 1,5-4.5 ml și pentru vârfuri;
- Cilindru gradat cu capacitatea de la 10 până la 450 ml;
- Hârtie de filtru;
- Crioeprobete 4 ml;
- Pipete Pasteur 3,0-3,5 ml.

Managementul și tratamentul oricărui caz suspect de difterie este administrarea promptă a antitoxinei difterice, care neutralizează orice toxină nelegată. Antitoxina trebuie administrată înainte de confirmarea de laborator. Antimicrobienele utilizate, cum ar fi penicilina sau eritromicina, vor ajuta la accelerarea eradicării cu succes a microorganismelor din tractul respirator, scăzând astfel încărcătura de toxine la pacient, precum și prevenirea și/sau limitarea răspândirii ulterioare a agentului patogen. Contactii unui caz confirmat de difterie prin investigarea de către laboratorul de referință, profilactic li se administrează un antimicrobian din grupul macrolidelor (ex. eritromicina) sau alte antimicrobiene eficiente pentru a limita răspândirea infecției.

Se recomandă testarea sensibilității la antimicrobiene la:

- toate izolatele de *C. diphtheriae* (indiferent de producerea de toxine);
- toate izolatele de *C. diphtheriae* (bolnavi și purtători);
- toate tulpinile semnificative din punct de vedere clinic de *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*, deoarece acestea pot provoca ocazional boli grave și chiar decese, în rândul pacienților cu risc, cum ar fi cei săraci, fără adăpost, alcoolici sau consumatori de droguri injectabile;
- tulpini relevante din punct de vedere clinic de *C. jeikeium*, *C. amycolatum* sau alte specii izolate din diverse prelevate, dintre care multe pot fi multirezistente la antimicrobiene.

Clasificarea finală a cazului depinde întotdeauna de confirmarea de laborator. Acest lucru este efectuat de Laboratorul Național de Referință din cadrul ANSP. Obiectivele cheie ale laboratorului de referință sunt de a consolida colaborarea și sprijinul de laborator, în special pentru cei care au nevoie mai mare, de a crește cunoștințele actuale și de a dezvolta și implementa noi tehnologii legate de diagnosticul de laborator și supravegherea epidemiologică a difteriei. Datorită necesității de medii specializate și a disponibilității limitate a antitoxinei, testarea toxigenității este de obicei efectuată numai de laboratorul național de referință. Prin urmare, laboratoarele de diagnostic trebuie să trimită izolatele suspecte și, în unele cazuri, specimenul original la Laboratorul Național de Referință.

În plus, laboratorul de referință joacă un rol important în formarea personalului privind diagnosticul de laborator al difteriei, atât în laboratoarele din cadrul ANSP, cât și în cele din alte instituții medicale și particulare din țară.

În multe cazuri, diagnosticul clinic de difterie precede în mod normal diagnosticul microbiologic. Cu toate acestea, primul indiciu al bolii este adesea dat de laboratorul microbiologic care raportează prezența microorganismului, de obicei *C. diphtheriae* sau *C. ulcerans* în probele recoltate din tractul respirator. Actualmente, disponibilitatea pe scară a tehnicii MALDI-TOF MS, speciile pot fi identificate rapid în câteva minute. Diagnosticul rapid și precis este de cea mai mare importanță. Diagnosticul clinic, în special în țările în care maladia se întâlnește rar, nu este ușor de stabilit și adesea se confundă cu alte infecții, cum ar fi amigdalita și faringita streptococică. Acest lucru subliniază rolul important al laboratorului în furnizarea de metode simple, rapide și fiabile pentru a ajuta clinicienii în stabilirea diagnosticului corect. Cu toate acestea, diagnosticul bacteriologic trebuie privit ca unul complementar și nu ca un substitut pentru diagnosticul clinic. De asemenea, laboratorul poate ajuta clinicianul prin excluderea cazurilor suspecte sau a contactilor, evitând astfel tratamentul și izolarea acestor pacienți. Laboratorul de diagnostic trebuie să trimită orice izolat presupus de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* la Laboratorul național de referință pentru confirmare și testarea toxigenității.

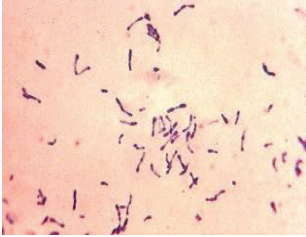
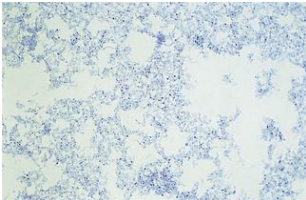
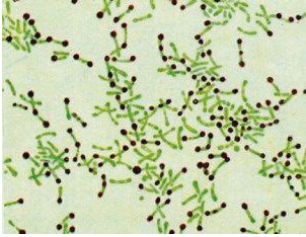

Metodele fenotipice convenționale necesită timp și ca rezultat raportarea rezultatelor este întârziată. Aceste metode au fost recent îmbunătățite prin PCR multiplex în timp real (RT-PCR), care detectează corinebacteriile purtătoare de gene care codifică toxina în câteva ore.

Potențial toxigene *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* sunt clasificate conform reglementărilor pentru agenții patogeni periculoși în grupul de pericol 2.

Fiecare laborator trebuie să aibă propriul său manual de siguranță, care descrie cerințele esențiale de securitate biologică, chimică, incendiu și electrică pentru a proteja personalul, comunitatea și mediul. Tot personalul trebuie să fie familiarizat cu conținutul manualului și trebuie să procedeze în conformitate. Personalul nou angajat este obligat să citească manualul și să fie conștient de riscurile implicate într-un laborator care testează agenții cauzali ai difteriei, înainte de a începe lucrul. Este necesar de respectat reglementările privind echipamentul individual de protecție pentru laboratorul respectiv și de purtat echipament de protecție adecvat la manipularea acestor agenți patogeni. Tot personalul care manipulează în mod obișnuit culturi de corinebacterii potențial toxigene trebuie să fie vaccinați (inclusiv vaccinări de rapel) în conformitate cu ghidul național de imunizare. Ideal ar fi ca, nivelul de anticorpi în serul personalului de laborator să fie verificat la fiecare trei ani, pentru a fi siguri că personalul are o imunitate adecvată.

Tehnici de colorare pentru identificarea *C. diphtheriae*

Tehnica	Procedeu
Gram	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pregătiți un frotiu fixat termic din cultura suspectată de <i>C. diphtheriae</i> 2. Inundați frotiul cu cristal violet și lăsați să stea timp de 1 min. 3. Clătiți cu apă 4. Aplicați soluția de iod timp de 1 min. 5. Clătiți cu apă 6. Aplicați acetonă/sol. alcool timp de 5-10 sec. (pentru decolorare) 7. Aplicați Safranină pentru 45 sec. 8. Clătiți cu apă și uscați 9. Examinați sub obiectivul de imersie în ulei.
Loeffler	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pregătiți un frotiu fixat termic din cultura suspectată de <i>C. diphtheriae</i> de pe mediul Loeffler 2. Aplicați colorantul albastru de metilen pentru 8 min. 3. Nu se spală 4. Uscați la aer
Albert	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pregătiți un frotiu, uscat și fixat termic 2. Aplicați colorantul Albert pentru 7 min. 3. Clătiți cu apă 4. Aplicați sol. iod Albert timp de 2 min. 5. Clătiți cu apă și uscați 6. Examinați sub obiectivul de imersie în ulei.
Neisser	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pregătiți un frotiu subțire și uscați bine la aer. Nu fixa termic. 2. Aplicați soluția 1 timp de 30 sec. 3. Clătiți cu apă 4. Aplicați soluția 2 pentru 1 min. 5. Clătiți bine cu apă și uscați 6. Examinați sub obiectivul de imersie în ulei.

Rezultatul	Scopul	Imaginea microscopică
<i>C. diphtheriae</i> este un bacil Gram-pozitiv; ocazional, poate fi Gram-negativ, sau Gram-variabil	Diferențierea microorganismelor Gram-pozitive și Gram-negative	
Granulațiile metacromatice se vor colora în violet, celula în albastru deschis	A pune în evidență fenomenul de metacromazie a granulațiilor de volutină	
Granulațiile metacromatice se vor colora în albastru-negru, restul celulei în verde.	A pune în evidență fenomenul de metacromazie a granulațiilor de volutină	
Granulațiile metacromatice se vor colora în albastru-negru, restul celulei în galben-marou.	A pune în evidență fenomenul de metacromazie a granulațiilor de volutină	

*Pregătirea probei trebuie efectuată într-un cabinet de biosecuritate clasa 1 sau într-un cabinet dedicat din zona curată în laborator.

A 9.1. Pregătirea probei din culturi bacteriene (de Zoysa și colab., 2016) – extracție

1. Distribuți 0,5 ml apă distilată (PCR apă liberă) în microtuburi sterile.
2. Transferați 1 μ l de proba și cele două de control proaspăt cultivate în microtuburi sterile care conțin 0,5 ml de apă.
3. Puneți tuburile care conțin suspensiile într-un bloc de încălzire uscat la 100 °C timp de 15 min.
4. Centrifugați timp de 1 min. la 10.000 rtm.
5. Transferați supernatantul cu ADN șablon într-un tub curat.

A 9.1.1. Pregătirea alternativă a probei pentru culturi bacteriene și probe clinice (folosind trusa de extracție)

ADN-ul bacterian poate fi extras, de asemenea, fie dintr-un tampon, fie din bacterii cultivate, folosind oricare kit de extracție sau platformă care a fost complet validată.

Tampoane din faringe colectate de la pacienți:

1. Tăiați sau rupeți vârful tamponului și suspendați în 200 μ l soluție de lizis și 40 μ l de soluție de proteinază K (20 mg/ml).
2. Se incubează la 55 °C timp de cel puțin 30 de min.
3. După dezintegrarea completă a piesei tampon, care poate fi examinată vizual, adăugați 200 μ l soluție de legare.
4. Se incubează la 70 °C timp de 10 min.
5. Adăugați 100 μ l de izopropanol și transferați amestecul în coloana de centrifugare High Pure.

Bacteriile cultivate:

1. Suspendați coloniile individuale în 200 μ l fosfat buffer salin (PBS) și 15 μ l de soluție de lizozimă (10 mg/ml în Tris-HCl, pH 8,0).
2. Se incubează la 37 °C timp de 10 min.
3. Adăugați 200 μ l soluție de legare și 40 μ l soluție de proteinază K (20 mg/ml).
4. Se incubează la 70 °C timp de 10 min.
5. Adăugați 100 μ l de izopropanol și transferați amestecul în coloana de centrifugare High Pure.
6. După etapele de centrifugare și spălare, eluați ADN-ul bacterian cu 200 μ l de eluție tampon.
7. Se folosește o alicotă de 2 μ l (pentru bacterii de cultură) sau o parte alicotă de 5 μ l (pentru tampoane procesate) pentru PCR.

A 9.1. Pregătirea Master – Mix

Denumirea Primer	Primer	Direcția Primer
Primer 1	5'-ATC-CAC-TTT-TAG-TGC-GAG-AAC-CTT-GGT-CA-3'	Forward
Primer 2	5'-GAA-AAC-TTT-TCT-TCG-TAC-CAC-GGG-ACT-AA-3'	Reverse

A 9.2.1. Pregătirea amestecului PCR

1. Se prepară amestecul de reacție PCR într-un microtub prin adăugarea de reactivi conform tabelului de mai jos. Master Mixul se calculează pentru fiecare proba luată în lucru, inclusiv controalele. Se repartizează câte 23 μ l de Master Mix în fiecare tub marcat.

Reagenți	Cantitatea x1 (μ l)	Concentrația finală
10 x Reaction buffer	2.5 μ l	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μ l	1.5 mM
Nucleotides: (10 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP)	0.5 μ l	200 μ M each dNTP
Taq polymerase (5 units/ μ l)	0.5 μ l	1.25 units
Primer 1 (15 pmol/ μ l)	1 μ l	0.6 pmol/ μ l
Primer 2 (15 pmol/ μ l)	1 μ l	0.6 pmol/ μ l
Water (PCR grade)	16.75 μ l	-
Total volume:	23 μ l	
Se adaugă a câte 2 μ l ADN probă biologică în fiecare tub, conform schemei protocolului		
Volumul total pentru reacție = 25 μ l		

2. Vortexați amestecul de reacție PCR.
3. Etichetați în mod corespunzător numărul necesar de microtuburi sterile (de exemplu, tulpină de testare, control pozitiv, negativ de extracție, control negativ PCR [apă]).
4. La fiecare tub PCR adăugați:
 - 48 μ l de amestec PCR,
 - 1 μ l proba ADN și
 - 1 μ l de PCR apă
 - Volumul total PCR = 50 μ l
5. Vortex.
6. Centrifugați amestecul timp de câteva secunde într-o microcentrifugă pentru a se depune lichidul și asigurați-vă că nu sunt bule.
7. Puneți toate tuburile într-un termociclor și porniți programul PCR cu parametrii de mai jos.
8. Produsele PCR pot fi rulate pe un gel de agaroză convențional și colorate în bromură de etidio sau pot fi rulate pe un gel de agaroză preturnat care conține etidio bromură (E-gel Invitrogen). Există, de asemenea, mai mulți coloranți alternativi care nu sunt cancerigeni, ce poate fi utilizat (de exemplu, „SYBBR Safe”).

Tabel: Condiții de amplificare PCR.

	Cicluri	Temperatura/Durata ciclului	
1	Denaturarea	96 °C / 2 min.	
2	Ciclarea	94 °C / 5 sec.	(35 cicluri)
		50 °C / 15 sec.	
		72 °C / 30 sec.	
3	Extensie	72 °C / 10 min.	

La finalizarea programului se imprimă rezultatele analizei.

Rezultate/Înregistrări

- Printurile împreună cu protocolul de lucru se fixează într-un dosar de lucru „Rezultate real-time RT-PCR”.
- Înregistrarea rezultatelor în registrul investigațiilor de laborator, metoda molecular-biologică.
- Emiterea buletinelor de analiză.

A 9.2.2. Prepararea amestecului PCR convențional modificat

Acesta este un exemplu de amestec PCR simplificat, folosind HotStarTaq Mastermix (Qiagen).

1. Preparați amestecul de reacție PCR într-un microtub prin adăugarea de reactivi conform tabelului.

Reagenți	Cantitatea x1 (μl)	Concentrația finală
HotStarTaq® Master Mix 2x	12.5 μl	1x
Primer 1 (15 pmol/μl)	1 μl	0.6 pmol/μl
Primer 2 (15 pmol/μl)	1 μl	0.6 pmol/μl
Water (PCR grade)	8.5 μl	-
Volum total	23 μl	
Se adaugă a câte 2 μl ADN probă biologică în fiecare tub, conform schemei protocolului		

2. Vortexați amestecul de reacție PCR.
3. Etichetați în mod corespunzător microtuburile sterile (de exemplu, test, tulpini de control, control negativ PCR [control apă]).
4. La fiecare tub se adaugă:
 - 18 μl de amestec PCR;
 - 2 μl matriță ADN/control apă
 - Volumul total PCR = 20 μl.
5. Vortex.

- Centrifugați amestecul timp de câteva secunde într-o microcentrifugă și asigurați-vă că nu există bule.
- Puneți toate tuburile într-un termociclor și porniți programul PCR cu parametrii descriși în tabelul de mai jos.

Tabel: Condiții de amplificare PCR.

	Cicluri	Temperatura/Durata ciclului	
1	Denaturarea	96 °C / 15 min.	
2	Ciclarea	94 °C / 15 sec.	(35 cicluri)
		50 °C / 15 sec.	
		72 °C / 30 sec.	
3	Extensie	72 °C / 10 min.	

- Produsele PCR pot fi rulate pe un gel de agaroză convențional și colorate în bromură de etidio (a se vedea A 9.2.3) sau pot fi executate pe un gel de agaroză preturnat care conține bromură de etidio (E gel Invitrogen) (a se vedea A 9.2.4). Există, de asemenea, mai mulți coloranți alternativi care nu sunt cancerigeni ce poate fi utilizat (de exemplu, „SYBBR Safe”).

A 9.2.3. Analiza produselor PCR: electroforeză convențională pe gel

Produsele PCR pot fi rulate pe un gel de agaroză convențional și colorate în bromură de etidio sau se rulează pe un gel de agaroză prefabricat care conține bromură de etidio (E-gel, Invitrogen).

Prepararea gelului de agaroză 3%:

- Se cântăresc 3 g de agaroză și se adaugă 100 ml de tampon 1 x Tris-Borate EDTA (TBE) într-un vas de formă conică. TBE este preparat ca o soluție de 5x buffer pH 8.0.
- Aduceți la fierț în cuptorul cu abur, dar nu lăsați să se ardă. Lăsați deoparte să se răcească la o temperatură aproximativ 50 °C.
- Pregătiți tava cu gel ștergând cu alcool 70%.
- Turnați gelul într-o tavă de gel și lăsați să se întărească.
- Puneți tava cu gel în rezervorul de electroforeză care conține tampon TBE pH 8,2.

Tabel: TBE 5x buffer pH 8.0

Chemical	Cantitate
Tris base	54 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml
Boric acid 0.9 M	27.5 g
Se adaugă H2O distilat până la 1000 ml	

A 9.2.3.1. Electroforeza produselor PCR

1. Amestecați 10 μ l de tampon de încărcare cu gel 1x (de exemplu, BlueJuice) cu 5 μ l de produs PCR.
2. Adăugați 15 μ l de probe în godeuri. Adăugați un standard de ADN adecvat (de exemplu, scară de 100 bp) într-una sau mai multe godeuri, după caz.
3. Probele sunt rulate la 150 V timp de aproximativ o oră.
4. Odată ce ați terminat de rulat, transferați gelul într-un recipient special selectat cu etidiobromură.
5. Gelul este colorat cu bromură de etidio timp de 30 min. și vizualizat pe un transiluminator UV.

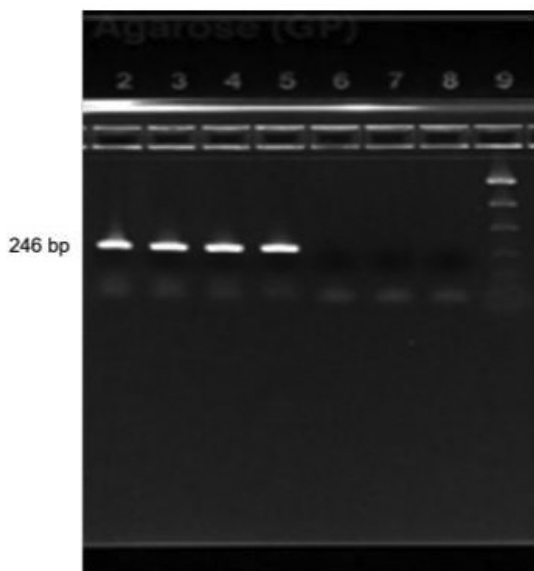
Alternativ, bromura de etidio poate fi adăugată în prealabil la gel în timpul preparării.

6. O reacție pozitivă pentru fragmentul A a genei este reprezentată de o singură bandă de 246 bp (vezi figura de mai jos).

A 9.2.4. Utilizarea gelurilor prefabricate (Invitrogen E-Gels) pentru rularea produselor PCR

Purtați mănuși și conectați E-Gel PowerBase la priza de curent.

1. Deschideți pachetul care conține gelul, scoateți-l cu grijă și introduceți caseta cu gel în Gel PowerBase.
2. Amestecați 10 μ l tampon de încărcare cu gel (de exemplu, BlueJuice) cu 5 μ l de produs PCR. Încărcați 10 μ l standard de ADN (de exemplu, standard E-gel) într-una sau mai multe godeuri, după caz.
3. Rulați gelul timp de 15 min. și vizualizați gelul pe un transiluminator UV.



Lane 2: Test isolate (toxin producer)

Lane 3: Test isolate (NTTB; non-toxicogenic toxin gene bearing)

Lane 4: NCTC 10648 (positive control; Elek strong positive)

Lane 5: NCTC 3984 (positive control; Elek weak positive)

Lane 6: NCTC 10356 (negative control; Elek negative)

Lane 7: Extraction negative control

Lane 8: PCR negative control

Lane 9: 100 bp Marker

A 9.3. qPCR pentru detectarea genei tox și a speciilor de *Corynebacterium* (DeZoyza 2016)

A 9.3.1. Scopul testului qPCR a speciilor de *Corynebacterium*

Acest test detectează simultan *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*/*C. pseudotuberculoza* potențial toxigen și non-toxigen în extractele de ADN din culturi. Testul vizează regiuni specifice a genelor *C. diphtheriae* și *C. ulcerans* rpoB și determină prezența genei toxinei prin țintirea „porțiunii A” (porțiunea activă) a genei toxinei difterice.

Exprimarea toxinei difterice de către tulpinile purtătoare de gene a toxinei trebuie întotdeauna confirmată de testul Elek.

A 9.3.3. Tipul testului RT-PCR: sonde de hibridizare dublă marcate

Testul este un test cvadruplex, optimizat pe platforma Qiagen Rotor-Gene Q, folosind canale după cum se arată mai jos. Platforma Rotor-Gene nu necesită utilizarea unei referințe pasive (de exemplu, ROX) și alegerea Texas Red ca colorant nu este compatibilă cu mastermix-uri care conțin ROX ca referință pasivă.

Tabel: Qiagen Rotor-Gene Q Canale și sonde

Canale	Excitație (nm)	Detectare (nm)	Combinăție Dye / Quencher	Ținta sondei
Albastru	450-490	510-530	FAM / BHQ-1	<i>C. ulcerans</i> and <i>C. pseudotuberculosis</i> (<i>rpoB</i> gene)
Verde	515-535	560-580	HEX / BHQ-1	<i>C. diphtheriae</i> (<i>rpoB</i> gene)
Galben	560-590	640-650	Texas Red/BHQ-2	Diphtheria toxin gene (<i>tox</i>)
Roșu	620-650	675-690	Cy5/BHQ-2	IPC (<i>gfp</i> gene)

Notă: Se poate înlocui ținta IPC (*gfp*) cu ținta 16S.

A 9.3.4. Materiale

- Tuburi sterile pentru microcentrifugă;
- Pipete Gilson: P1000, P200, P20, P10 (sau echivalent);
- Vârfuri sterile cu filtru;
- Tampon Tris-EDTA (TE) grad PCR pH 8,0;
- Primeri și sonde (vezi Tabelul de mai jos);
- ADN martori pozitivi (extras din *C. diphtheriae* toxigen [NCTC 10648] și *C. ulcerans* netoxigen [NCTC 12077]);
- IPC: ADN-ul IPC descris aici cuprinde plasmida pGFP, care conține *gfp* gena (din *Aequorea victoria*) donată într-o plasmidă bacteriană. Alicote de 10 μl de 500 copii/μl și depozitate -20 °C sau mai jos. Se adaugă 90 μl de apă PCR la o alicotă în ziua utilizării pentru o soluție de lucru de 50 de copii/μl. O alternativă controlul IPC comercial poate fi utilizat în schimb;

- Apă fără nucleaze;
- Tuburile PCR în timp real;
- Tuburi sterile de 0,5 ml/1,5 ml (pentru depozitarea primerilor alicotați corespunzător);
- Tampon Tris-HCl grad PCR pH 8,0.

Tabel: Primeri pentru multiplex qPCR.

Gena țintă	Oligo denumirea	Secvență	Fragment
<i>C. diphtheriae</i> rpoB	dip_rpobF	CGTTTCGCAAAGATTACGGAACCA	97bp
	dip_rpobR	CACTCAGGCGTACCAATCAAC	
	C. dip HP	HEX-AGGTTCCGGGGCTTCTCGATATTCA-BHQ1	
<i>C. ulcerans</i> rpoB	ulc_rpobF	TTGCGATGGCTCATTGGCAC	98bp
	ulc_rpobR	TCCAGGATGTCTTCCAGTCC	
	CulcH	FAM-CCAGCAGGAGGAGCTGGGTGAA-BHQ1	
tox	toxAF	CTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA	117bp
	toxAR	CTATAAAACCCTTTCCAATCATCGTC	
	diptoxHP	Texas Red –AAGGTATACAAAAGCCAAAATCTGGT ACACAAGG-BHQ2	
gfp	gfp_FP	CCTGTCCTTTTACCAGACAACCA	77bp
	gfp_RP	GGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCT	
	gfp_HP	Cy5-TACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCG-BHQ2	

A 9.3.5. Extragerea ADN-ului

1. Pregătiți extracte de ADN din izolate bacteriene.
2. De asemenea, extrageți ADN din tulpinile martor pozitiv NCTC 10648 (*C. diphtheriae* toxigen) și NCTC 12077 (*C. ulcerans* netoxigen). (Acest lucru se poate face din timp și poate fi extras ADN-ul păstrat înghețat.)
3. Includeți IPC ca probă de extracție. Scoateți o parte alicotă din stoc de plasmidă IPC și diluați-o 1/10 înainte de utilizare adăugând 90 μl TE 1x pH 8,0 în tub și amestecându-l.
4. Opțional: pregătiți stocuri de ADN purificate de tulpini de control pozitiv: Dacă efectuați qPCR cantitativ folosind standarde comerciale, urmați instrucțiunile producătorului. Pregătiți-vă propriile controale standard pentru curbe, urmați instrucțiunile de mai jos:
 - a. Extrageți ADN din tulpinile de control pozitiv NCTC 10648 (*C. diphtheriae* toxigen) și NCTC 12077 (*C. ulcerans* non-toxigen) folosind un kit comercial
 - b. Cuantificați ADN-ul utilizând o metodă adecvată (de exemplu, fluorometrul Qubit).
 - c. Pregătiți diluții în serie ale ADN-ului (de exemplu, 1000, 100 și 10 copii ale genomului/μl) în 10 mM Tris-HCl pH 8,0.
 - d. Se prepară alicote de unică folosință (5 μl); se păstrează la –20 °C.

A 9.3.6. Prepararea unui amestec de primer/sondă

1. Pregătiți amestecul primer/sondă în avans:
 - a. Se amestecă stocurile de 100 μM (100 pmol/ μl) de primeri (forward and reverse) și sonde descrise în tabelul de mai jos.
 - b. Etichetați amestecul ca „Dip4plex”, indicând volumul final de pe tub.
 - c. Înainte de a utiliza fiecare nou lot de amestec de primer/sondă pentru a testa probe, efectuați un QC (controlul calității) folosind probele de control pozitiv și control negativ.
 - d. Tubul „Dip4plex” trebuie depozitat într-un congelator la $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabel: Pregătirea primer/probe mix (Dip4plex mix)

Reagent		1 ml mix	1.5 ml mix	2 ml mix	Final conc. in Dip4plex mix
Primer/sondă [100 pmol/ μl stoc]	dip rpob-F	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	dip rpob-R	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	C. dip HP	20 μl	30 μl	40 μl	2 μM
	ulc rpob-F	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	ulc rpob-R	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	C-ulc HP	20 μl	30 μl	40 μl	2 μM
	toxA-F	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	toxA-R	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	Diptox HP	20 μl	30 μl	40 μl	2 μM
	gfp-FP	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	gfp-RP	50 μl	75 μl	100 μl	5 μM
	gfp HP	20 μl	30 μl	40 μl	2 μM
Buffer	TE 1x pH 8.0	520 μl	780 μl	1040 μl	
Volum final		1000 μl	1500 μl		

1. În camera curată PCR pregătiți amestecul de reacție

RT-PCR reaction mix

Reagenți	Cantitatea x1 (μl)	Concentrația finală
PCR grade H2O	2 μl	-
Dip4plex 20x	1 μl	1x
pGFP [50 copies/ μl]	2 μl	5 copies/ μl
Rotor-Gene Multiplex PCR Mix (2x)	10 μl	1x
Distribuiți 15 μl în fiecare tub		
Adăugați 5 μl de proba ADN		

2. Centrifugați amestecul timp de câteva secunde într-o microcentrifugă pentru a se depune lichidul și asigurați-vă că nu sunt bule.
3. Puneți toate tuburile într-un termociclor și porniți programul PCR cu parametrii de mai jos.

Tabel: Condiții de amplificare PCR

	Cicluri	Temperatura/Durata ciclului	
1	PCR activation step	95 °C / 5 min.	
2	Ciclarea	95 °C / 10 sec.	(45 cicluri)
		60 °C / 20 sec.	

A 9.3.7. Analiza datelor

1. După finalizarea testului qPCR, analizați rezultatele pentru a determina valorile Ct (ciclul la care fluorescența traversează linia de prag). Pentru Rotor-Gene, o valoare de prag de 0,05 este recomandat. Valoarea pragului optim va trebui determinată separat pentru o altă platformă PCR.
2. Verificați pragul pentru a evita un rezultat fals pozitiv, mai ales când fluorescența probelor de control negativ crește ușor. Dacă se întâmplă acest lucru, puteți crește pragul peste 0,05 pentru a preveni valorile Ct false.

A 9.3.8. Interpretarea rezultatelor

1. Verificați dacă probele de control pozitiv au produs rezultatele așteptate (a se vedea tabelul de mai jos). Dacă nu au făcut-o, poate exista o problemă cu rularea PCR.
2. Interpretați rezultatele PCR pentru probele de testat conform tabelului.
3. Dacă rezultatul PCR indică o genă a toxinei care poartă *C. diphtheriae* sau o genă a toxinei care poartă *C. ulcerans/C. pseudotuberculosis* rezultatul trebuie confirmat prin testul fenotipic Elek.
4. Dacă rezultatul este inhibitor sau echivoc, luați în considerare dacă să repetați PCR (și posibil extragerea ADN-ului).

Tabel: Interpretarea rezultatelor din qPCR multiplex

<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. ulcerans / C. pseudotuberculosis</i>	Toxin gene	IPC	Rezultat
+	-	+	+	<i>C. diphtheriae</i> Toxigen
+	-	-	+	<i>C. diphtheriae</i> Non-Toxigen
-	+	+	+	<i>C. ulcerans</i> Toxigen
-	+	-	+	<i>C. ulcerans</i> Non-Toxigen
-	-	-	+	Negative
-	-	-	-	PCR inhibitor
+	-	-	-	Rezultat dubios (trebuie repetat)
-	-	+	+	Rezultat dubios (trebuie repetat)

Odată ce corinebacteriile au fost identificate prin PCR cantitativă, sunt utilizate teste suplimentare pentru a confirma identificarea și a determina toxicitatea izolatului. Acestea sunt, de obicei, efectuate în laboratoare naționale de referință.

Tiparea secvenței multilocus

Pentru tiparea secvenței multilocus (MLST) a *C. diphtheriae* și *C. ulcerans* utilizează informațiile de secvență nucleotidice din fragmentele interne ale celor șapte gene descrise mai jos pentru a defini ST pentru fiecare izolat.

A 10.1. Tiparea secvenței multilocus (MLST) pentru *C. diphtheriae*

Tabel: Primeri MLST pentru PCR

Gena	Direcția	Secvența de primer	Dimensiunea ampliconului (bp)
<i>atpA</i>	Forward	gcgattgcgaactacacc	1029
	Reverse	Ctcgaggaatacctracc	
<i>dnaE</i>	Forward	tgcgtcatctgattgaaa	858
	Reverse	cggccaataagacacca	
<i>dnaK</i>	Forward	actgggtggcggtactt	696
	Reverse	tgggaacgtctcggaac	
<i>fusA</i>	Forward	taccgcgagaagctcggt	683
	Reverse	gaaggttgggtcctcttc	
<i>leuA</i>	Forward	cgtgcacttctacaactc	865
	Reverse	accgtgatcggcttcat	
<i>odhA</i>	Forward	cggcaaggaascacatgac	505
	Reverse	ggtgtcgccraacatctg	
<i>rpoB</i>	Forward	aagcgcaagatccaggac	845
	Reverse	tcgaactcgctgcatcc	

Tabel: Primeri MLST pentru secvențiere

Gena	Direcția	Secvența de primer	Dimensiunea ampliconului (bp)
<i>atpA</i>	Forward	agaaggcgacgaagtmaagc	378
	Reverse	crgaatcagaagctggwgca	
<i>dnaE</i>	Forward	gtgcgacaagctgggtg	354
	Reverse	ggcttwcgccattyttg	
<i>dnaK</i>	Forward	agatggctatgcagcgtct	345
	Reverse	gatgagcttggctatcacg	
<i>fusA</i>	Forward	cgtaagctgaccgtaactc	360
	Reverse	ccatggactcraggatga	
<i>leuA</i>	Forward	ccyatcatcatcaayctgcc	384
	Reverse	cagctggttgagctatc	
<i>odhA</i>	Forward	tbcaagatcgcatygarrc	381
	Reverse	twggctcgatgtgkcttc	
<i>rpoB</i>	Forward	cgwatgaacatyggbcagg	342
	Reverse	tccatytccraarcgctg	

A 10.1.1. Reacției PCR (de făcut pentru fiecare alelă)

Volum total pentru o reacție PCR = 25 μ l.

Tabel: Pregătirea reacției PCR pentru tiparea secvenței multilocus (MLST) a *C. diphtheriae*.

Pentru alele – dnaK, fusA, lenA, odhA, rpoB	
Multiplex Master Mix (Qiagen)	10 μ l
soluție Q	5 μ l
Forward primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Reverse primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Water (Apa PCR)	5 μ l
ADN proba	3 μ l
Volum total	25 μl

Tabel: Pregătirea reacției PCR pentru tiparea secvenței multilocus (MLST) a *C. diphtheriae*.

Pentru alele – atpA, dnaE	
Multiplex Master Mix (Qiagen)	10 μ l
soluție Q	5 μ l
25 M MgCl ₂	2 μ l
Forward primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Reverse primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Water (Apa PCR)	3 μ l
ADN proba	3 μ l
Volum total	25 μl

Tabel: Condiții de amplificare PCR

Cicluri	Temperatura/Durata ciclului
1 ciclu	95 °C / 1 min.
35 de cicluri	96 °C / 1 min.
	58 °C / 1 min.
	72 °C / 2 min.
1 ciclu	72 °C / 5 min.

Tabel: Montarea reacției PCR pentru secvențiere

Componentă de reacție	Volum
RR mix	0,5 μ l
Sequencing buffer	1,75 μ l
Forward primer (2 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Reverse primer (2 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Water (Apa PCR)	6,25 μ l
ADN proba	1 μ l
Volum total	10 μl

Tabel: Condiții de amplificare PCR

Cicluri	Temperatura/Durata ciclului
1 ciclu	96 °C / 1 min.
25 de cicluri	96 °C / 10 sec.
	50 °C / 5 sec.
	60 °C / 4 min.

A 10.2. Tiparea secvenței multilocus (MLST) pentru *C. ulcerans*

O schemă separată de tiparea secvenței multilocus (MLST) pentru *C. ulcerans* a fost propusă de König C și colegii săi, deoarece *C. ulcerans* toxigen poate fi agent patogen care cauzează difteria (König et al., 2014). Primerii pentru *atpA*, *dnaA*, *fusA*, *odhA* și *rpoB* sunt identici cu *C. diphtheriae* din referința Bolt și colab. (2010). Primerul utilizat pentru *dnaK* și *leuA* a fost adaptat la *C. ulcerans* în conformitate cu genomul lui (*C. ulcerans* 809) (König și colab., 2014). Amplificarea locusului și secvențierea pentru analiza MLST se bazează pe schema publicată pentru *C. diphtheriae* cu modificări minore. Fiecare PCR a fost efectuată într-un volum total de 50 µl utilizând HotStarTaq Master Mix (Qiagen).

Tabel: Primeri MLST pentru PCR *C. ulcerans*

Gena	Direcția	Secvența de primer	Dimensiunea ampliconului (bp)
<i>atpA</i>	Forward	gcgattgcgaactacacc	1029
	Reverse	ctcgaggaatacctracc	
<i>dnaE</i>	Forward	tgcgtcatctgattgaaa	858
	Reverse	cggccaataagacacca	
<i>dnaK</i>	Forward	acttgggtggcggaacct	687
	Reverse	tggtaaaggctcagaa	
<i>fusA</i>	Forward	taccgcgagaagctcggt	683
	Reverse	gaagggtgggtcctcttc	
<i>leuA</i>	Forward	cgttcacttctacaattc	864
	Reverse	gccgtggcagttttcat	
<i>odhA</i>	Forward	cggcaaggaaascatgac	505
	Reverse	gttgtcgccraacatctg	
<i>rpoB</i>	Forward	aagcgcaagatccaggac	845
	Reverse	tcgaactcgtcgtcatcc	

Tabel: Primeri MLST pentru secvențiere *C. ulcerans*

Gena	Direcția	Secvența de primer	Dimensiunea ampliconului (bp)
<i>atpA</i>	Forward	gcgattgcgaactacacc	378
	Reverse	ctcgaggaatacctracc	
<i>dnaE</i>	Forward	tgcgcatctgattgaaa	354
	Reverse	cggtccaataagacacca	
<i>dnaK</i>	Forward	acttgggtggcggaacct	345
	Reverse	tggtaaaggctcagaa	
<i>fusA</i>	Forward	taccgcgagaagctcgtt	360
	Reverse	gaaggttgggtcctcttc	
<i>leuA</i>	Forward	cgttcacttctacaattc	384
	Reverse	gccgtggtcagtttcat	
<i>odhA</i>	Forward	cggcaaggaascacatgac	381
	Reverse	gttgtcgccraacatctg	
<i>rpoB</i>	Forward	aagcgcaagatccaggac	342
	Reverse	tcgaactcgctcatcc	

Tabel: Condiții de amplificare PCR (*atpK*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *odhA* și *rpoB*)

Cicluri	Temperatura/Durata ciclului
1 ciclu	95 °C / 15 min.
35 de cicluri	94 °C / 1 min.
	58 °C / 1 min.
	72 °C / 2 min.
1 ciclu	72 °C C / 5 min.

Tabel: Condiții de amplificare PCR (*leuA*)

Cicluri	Temperatura/Durata ciclului
1 ciclu	95 °C / 15 min.
10 de cicluri	94 °C / 1 min.
	60-50 °C / 1 min. (minus 1 °C per ciclu)
	72 °C / 2 min.
25 de cicluri	94 °C / 1 min.
	60-50 °C / 1 min.
	72 °C / 2 min.
1 ciclu	72 °C / 5 min.

REFERINȚE

1. Alibi S., Ferjani A., Boukadida J., Ruiz de Alegria C, Martinez-Martinez L, Navas J. Evaluation of the VITEK-MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for the identification of clinical *Corynebacterium* species. *Rev Esp Quimioter.* 2017;30(1): 57-58 PMID: 27898209.
2. Badell E, Guillot S, Tulliez M, Pascal M, Panunzi LG, Rose S, et al. Improved quadruplex realtime PCR assay for the diagnosis of diphtheria. *J Med Microbiol.* 2019;68(10):1455-1465. doi: 10.1099/jmm.0.001070.
3. Bao R, Gao X, Hu B, Zhou Z. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for identification of *Corynebacterium* species. *J Thorac Dis.* 2017 Sep;9(9):3239-3245 doi: 10.21037/jtd.2017.09.69.
4. Barh D, Jain N, Tiwari S, Parida BP, D'Afonseca V, Li L et al. A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and other CMN group of human pathogens. *Chem Biol Drug Des* 2011;78: 73-84 doi: 10.1111/j.1747- 0285.2011.01118.x.
5. Berger A, Huber I, Merbecks SS, Ehrhard I, Konrad R, Hörmansdorfer S et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in woman and cat. *Emerg. Inf. Dis.* 2011;17(9):1767-1768 doi: 10.3201/eid1709.110391. Berger A, Hogardt M, Konrad R, Sing A. Detection methods for laboratory diagnosis of diphtheria. In: Burkovski, A. (ed.), *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Genomics, Pathogenicity and Applications. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2014:171-205.
6. Bernard KA, Pacheco AL, Burdz T, Wiebe D. Increase in detection of *Corynebacterium diphtheriae* in Canada: 2006-2019. *Can Commun Dis Rep* 2019;45(11):296-301. doi: 10.14745/ccdr.v45i11a04.
7. Billard-Pomares T, Rouyer C, Walewski V, Badell-Ocando E, Dumas M, Zumelzu C et al. Diagnosis in France of a non-toxigenic tox gene-bearing strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a young male back From Senegal. *Open Forum Infect Dis.* 2017; 4(1): ofw271. doi: 10.1093/ofid/ofw271
8. Boschert V, Berger A, Konrad R, Huber I, Hörmansdorfer S, Zöls S, Eddicks M et al., *Corynebacterium* spp. nasal carriage in pigs and their farmers in Bavaria, Germany: implications for public health. *Vet Rec* 2014; 175:248 doi: 10.1136/vr.102634.
9. Dangel A, Berger A, Konrad R, Sing A. NGS-based phylogeny of diphtheria-related pathogenicity factors in different *Corynebacterium* spp. implies species-specific virulence transmission. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):28. doi: 10.1186/s12866-019-1402-1.
10. Dangel A, Berger A, Konrad R, Sing A. NGS-based phylogeny of diphtheria-related pathogenicity factors in different *Corynebacterium* spp. implies species-specific virulence transmission. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):28. doi: 10.1186/s12866-019-1402-1
11. Dazas M, Badell E, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, Brisse S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Dec;68(12):3826-3831. doi: 10.1099/ijsem.0.003069.

12. De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, Harrison TG, Fry NK. Development, validation and implementation of a quadruplex real-time PCR assay for identification of potentially toxigenic corynebacteria. *J Med Microbiol.* 2016;65(12):1521-1527. doi: 10.1099/jmm.0.000382.
13. Rusu Galina. Boli infecțioase la copii. Manual (ediția III). Chișinău, 2021, p. 8-22.
14. Streinu-Cercel Adrian, Aramă Victoria, Calistru Petre Iacob. Boli infecțioase. Curs pentru studenți și medici rezidenți. Volumul 1. Editura universitară "CAROL DAVILA" 2019, p. 71-80.
15. Дифтерия у детей. Республиканский центр развития здравоохранения МЗ РК. Клинические протоколы МЗ РК – 2017. <https://diseases.medelement.com/disease>
16. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным дифтерией. Санкт-Петербург, 2015.
17. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Шамшева О.В. Инфекционные болезни у детей. Учебник ГЭОТАР, 2011.
18. World Health Organization. Diphtheria. Vaccine-Preventable Diseases. Surveillance Standards. Last updated: September 5, 2018. <https://cdn.who.int/media/docs>.
19. Diphtheria (*Corynebacterium diphtheriae*) 2019. Surveillance Case Definitions. National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS). CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People. <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/diphtheria-2019>.
20. WHO Position Paper on Diphtheria. Vaccin antidiphthérique: Note de synthèse de l'OMS – août 2017. *Weekly Epidemiological Record* 92 (31), 417 - 435.

