UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

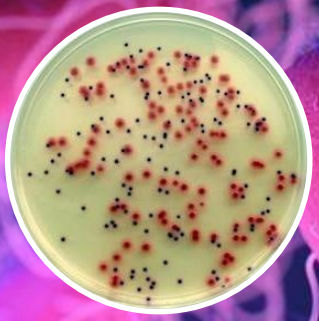
ELENA HOGEA

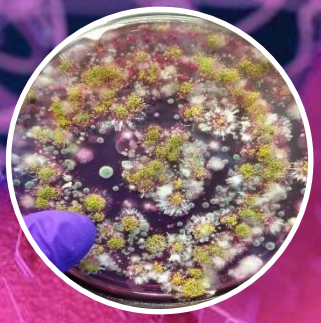
LIVIA STÂNGĂ

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

Lucrări practice

MEDICINĂ DENTARĂ





GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Editura „Victor Babeș”
Timișoara, 2021

Editura „Victor Babeş”
Piaţa Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timişoara
Tel./ Fax 0256 495 210
e-mail: *evb@umft.ro*
www.umft.ro/editura

Director general: Prof. univ. emerit dr. Dan V. Poenaru

Referent ştiinţific: Prof. univ. dr. Andrei Motoc

Colecţia: GHIDURI ŞI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecţie: Conf. univ. dr. Adrian Vlad

Indicativ CNCSIS: 324

© 2021 Toate drepturile asupra acestei ediţii sunt rezervate.
Reproducerea parţială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă şi se va sancţiona conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-237-9

Cuprins

1. Principii generale de conduită în laboratorul de microbiologie, norme de protecție a muncii 4

2. Dezinfecția și sterilizarea în practica stomatologică 6
2.1. Decontaminarea suprafețelor din cabinetul de stomatologie 7
2.2. Metode de sterilizare utilizate în practica stomatologică 14
2.3. Controlul sterilizării 20
2.4. Dezinfecția mâinilor 25

3. Medii de cultură 29

4. Etapele diagnosticului bacteriologic: recoltare, examen macroscopic și microscopic, izolarea și identificarea bacteriilor din produsele patologice 35
4.1. Recoltarea produselor patologice 35
4.2. Examenul macroscopic 41
4.3. Examenul microscopic direct din produs patologic 41
4.4. Însămânțarea pe medii de cultură (cultivarea) pentru izolare 42
4.5. Identificarea germenilor din cultură pură 43
4.6. Metode moleculare (extracție de acizi nucleici, amplificare, detecție) 45
4.7. Testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase (antibiograma) 46

5. Testarea sensibilității la antibiotice a germenilor izolați în infecții 50
5.1. Antibiograma difuzimetrică Kirby- Bauer 50
5.2. Metoda diluțiilor în mediu lichid 52
5.3. Metoda diluțiilor în agar 52
5.4. Metoda microdiluțiilor pe sistemul Vitek 52
5.5. Testul E 53

6. Reacții imunologice în diagnosticul de laborator al infecțiilor 54
6.1. Reacția de aglutinare bacteriană 54
6.2. Reacțiile de precipitare 55
6.3. Reacții cu participarea complementului 56
6.4. Reacții cu utilizarea Ac marcați 57

Bibliografie 58

1. Principii generale de conduită în laboratorul de microbiologie, norme de protecție a muncii

Rolul laboratorului de microbiologie medicală

Microbiologia se ocupă cu studiul microorganismelor implicate în patologia umană și interacțiunile macroorganismul uman și aceste microorganisme.

Clinicianul așteaptă rezultatele de laborator pentru a confirma sau infirma un diagnostic sau o stare (purtător sănătos de germeni patogeni).

Laboratorul de Microbiologie trebuie să fie amplasat la distanță de zona unde sunt prelevate probele biologice și de aria unde se eliberează rezultatele deoarece este trafic intens de persoane.

Compartimentarea laboratorului trebuie să respecte normele de funcționare astfel încât să se evite deplasările inutile de personal dar și ale materialelor cu risc de contaminare.

Orice laborator de microbiologie are următoarele compartimente:

- Spațiu destinat primirii probelor
- Spațiu unde se prelucrează produsele biologice
- Spațiu destinat preparării mediilor de cultură
- Spațiu destinat depozitării mediilor de cultură, reactivilor
- Spațiu pentru spălarea, decontaminarea materialelor
- Birou, vestiar

Instalații și echipamente:

- Curent electric, instalație de gaz metan, apă curentă caldă și rece, canalizare
- Instalație de azot pentru anaerobioză
- Microscop optic cu fond luminos, cu contrast de fază, cu fluorescență
- Incubatoare și camere termostat pentru incubarea culturilor
- Frigidere, camere frigorifice pentru conservarea mediilor de cultură și a unor reactivi
- Congelatoare cu azot lichid sau CO_2 solid
- Centrifugă care asigură sedimentarea bacteriilor
- Balanțe tehnice și balanțe pentru echilibrarea tuburilor de centrifugă
- Recipiente (găleți, cutii de hârtie) cu capac pentru materialul contaminat
- Recipiente din sticlă (lame, pipete, eprubete, baloane)
- Articole din material plastic de unică folosință (cutii Petri, anse, eprubete)
- Ansă bacteriologică din sârmă sau material plastic (de unică folosință)
- Autoclav pentru prepararea mediilor de cultură și inactivarea materialului infecțios
- Pupinel (etuvă) pentru sterilizarea cu căldură uscată
- Lămpi UV bactericide pentru sterilizarea aerului și a suprafețelor
- Aparatură pentru incubarea automată a hemoculturilor
- Sisteme automate de identificare a microorganismelor

Norme de protecția muncii

- Purtarea de echipament de protecție: halat cu mânecă lungă, mănuși, capelină, mască, botoși
- În laborator nu se mănâncă, nu se bea și nu se fumează
- Materialele sterile și cele contaminate se manipulează în condiții aseptice pentru a evita contaminarea suprafețelor de lucru, a mediilor de cultură sau infectarea persoanelor care lucrează
- Ansa bacteriologică se sterilizează înainte și după utilizare prin încălzirea până la roșu în flacără
- Pipetele gradate și pipetele Pasteur după utilizare vor fi puse în vase cilindrice care conțin soluție sulfocromică
- Baloanele, eprubetele și plăcile Petri cu produse biologice sau culturi bacteriene care nu mai sunt utilizate vor fi puse în recipiente speciale pentru infecte în vederea sterilizării
- În cazul în care masa de lucru este contaminată cu bacterii se acoperă cu o soluție concentrată de dezinfectant, se lasă sa acționeze 5-10 minute, apoi se spală cu apă și detergent
- Mâinile se spală frecvent cu apă și săpun, operațiune obligatorie și la sfârșitul programului de lucru
- Înainte de părăsirea laboratorului se vor închide sursa de apă, gaz și curent electric.

2. Dezinfecția și sterilizarea în practica stomatologică

Decontaminarea reprezintă orice proces utilizat pentru îndepărtarea și distrugerea microorganismelor și include: curățarea, dezinfecția și sterilizarea.

Curățarea - etapă preliminară obligatorie, permanentă și sistematică în cadrul oricărei activități sau proceduri de îndepărtare a murdăriei (materie organică și anorganică) de pe suprafețe (inclusiv tegumente) sau obiecte, prin operațiuni mecanice sau manuale, utilizându-se agenți fizici și/sau chimici.

De regulă este urmată de dezinfecție sau dezinfecție și sterilizare.

Dezinfecția - procedura de distrugere a majorității microorganismelor patogene sau nepatogene de pe orice suprafețe (inclusiv tegumente), utilizându-se agenți fizici și/sau chimici;

În raport de acțiunea substanței dezinfectante, dezinfecția poate fi:

► **dezinfecție de nivel înalt** - realizează distrugerea bacteriilor în forma vegetativă, a fungilor, a virusurilor, a micobacteriilor și a majorității sporilor bacterieni; această forma de dezinfecție se poate aplica și dispozitivelor medicale reutilizabile, destinate manevrelor invazive, și care nu suportă autoclavarea;

► **dezinfecție de nivel intermediar (mediu)** - realizează distrugerea bacteriilor în formă vegetativă, a fungilor, a micobacteriilor și a virusurilor, fără acțiune asupra sporilor bacterieni;

► **dezinfecție de nivel scăzut** - realizează distrugerea majorității bacteriilor în formă vegetativă, a unor fungi și a unor virusuri, fără acțiune asupra micobacteriilor, sporilor de orice tip, virusurilor neanvelopate și a mucegaiurilor.

Germicidele sunt substanțe care distrug microorganismele, dar nu neapărat și sporii bacterieni. Efectul lor poate fi bactericid, bacteriostatic, sporicid, tuberculocid, fungicid și virucid. Ele se împart în:

❖ **antiseptice** – utilizate pentru țesuturi vii (tegumente, mucoase, plăgi), ele fiind mai puțin toxice pentru organismul uman;

❖ **dezinfectante** – substanțe puternic bactericide la concentrații relativ scăzute, dar datorită efectului toxic sau iritant asupra țesuturilor umane, se utilizează doar pentru obiecte și suprafețe. Uneori, aceeași substanță (ex. Cloramina B) poate fi antiseptic sau dezinfectant, în funcție de concentrația utilizată.

Biofilm - un strat subțire de microorganisme care aderă puternic la suprafețe organice sau anorganice și care este foarte rezistent la unele substanțe biocide.

Sterilizarea este un termen absolut, cuprinde ansamblul de tehnici fizice și chimice care elimină toți germenii viabili (bacterii, spori, fungi, virusuri, paraziți) de pe suprafața sau interiorul unui corp. Sterilizarea nu presupune nu- mai înlăturarea completă a microorganismelor, ci și prevenirea recontaminării obiectelor sterilizate.

2.1. Decontaminarea suprafețelor din cabinetul de stomatologie

2.1.1. Dezinfecția UNIT-ului dentar

Sunt utilizate, curent, două tehnici diferite ca modalitate de execuție, dar ambele bazate pe utilizarea unor compuși chimici (dezinfectante) cu bună activitate asupra bacilului tuberculozei, virusului hepatitei B, virusul hepatitei C, virusului imunodeficienței umane.

A) Tehnica 1 utilizează dezinfectante sub formă de sprayuri și prosoape din hârtie, dispozabile.

Modul de lucru:

- Protejează mâinile cu mănuși din cauciuc gros, rezistent (mănuși de menaj).
- Colectează materialul dispozabil în pungi de plastic și transportă materialul reutilizabil în camera de spălare și dezinfecție.
- Spală mâinile înmănușate și dezinfectează mănușile după uscarea cu un prosop din hârtie.
- Pulverizează dezinfectantul pe un prosop din hârtie și șterge ferm suprafețele netede ale UNIT-ului dentar (masă, fotoliu, lampă). Dacă suprafața a fost contaminată cu sânge, pulverizează direct dezinfectantul și lasă să acționeze mă- car 10 minute.
- Pe fiecare piesă a UNIT-ului, furtunul de legare și tub de susținere corespunzător, pulverizează abundent dezinfectantul și apoi șterge ferm cu un prosop din hârtie. Insistă cu o perie la nivelul anfractuozităților piesei, precum și pe peretele interior al tubului.
- Când toate piesele au fost dezinfectate, așază-le în lăcașul lor și pulverizează dezinfectant asupra întregului UNIT.
- Lasă 10 minute sau mai mult pentru ca substanța să își exercite efectul antimicrobian și apoi îndepărtează excesul de lichid prin tamponare cu un prosop din hârtie.

B) Tehnica II folosește dezinfectantele în soluție și bureți din voal cu dimensiunile de 10 x 10 cm. Este preferat hipocloritul de sodiu și formal contra-indicați iodoforii. Etapele de lucru sunt cele precizate la tehnica I, dar utilizând buretele umezit cu dezinfectant.

Ambele tehnici, eficiente microbiologic, sunt destul de costisitoare și, mai ales, generează „timpi morți” în activitatea stomatologului (timpul de acțiune a dezinfectantului), deoarece aceste operații trebuie realizate nu numai la începutul și sfârșitul zilei de lucru, dar și după fiecare pacient.

Acești timpi morți pot fi evitați prin utilizarea huselor din hârtie, foliilor din aluminiu sau material plastic, cu forme și dimensiuni adecvate fiecărei piese din UNIT care ar trebui dezinfectată după fiecare pacient. Dezinfecția completă,

riguroasă, prin una din tehnicile de mai sus trebuie realizată numai la începutul și sfârșitul activității zilnice. După prima dezinfecție, suprafețele UNIT-ului sunt acoperite cu astfel de huse ce trebuie schimbate după fiecare pacient.

Rețineți! Piesele de mână și seringa de aer-apă sunt supuse unei contaminări masive în timpul tratamentelor stomatologice. De aceea, orice piesă a UNIT-ului dentar care nu poate fi acoperită trebuie dezinfectată sau sterilizată în vederea utilizării ei la un alt pacient.

În sistemele de apă dentară se poate multiplica, peste noapte, bacilul piocianic. De aceea, este recomandată „spălarea" sistemului la începutul fiecărei zile de lucru: seringa de aer-apă și piesele de mână de înaltă viteză sunt lăsate să funcționeze în gol cca 30 de secunde înainte de utilizarea la primul pacient.

Deși nu face parte din UNIT, paharul pentru apă este supus unei contaminări comparabile cu cea a pieselor de mână; de aceea nu este suficientă simpla clătire cu apă înainte de utilizarea sa la un alt pacient. Sunt necesare pahare de unică folosință sau pahare care pot fi sterilizate prin aer cald (la pupinel, timp de o oră, la 180°C), după spălare cu apă și detergent.

Figura 1. Cabinet dentar – unit dentar

2.1.2. Dezinfecția suprafețelor din cabinetul stomatologic

Mobilierul cabinetului de stomatologie și, în special, suprafețele orizontale ale acestuia, trebuie dezinfectate zilnic, obligatoriu la sfârșitul zilei de lucru. Trei tipuri de substanțe antimicrobiene sunt recomandate în acest scop:

1. Iodoforii, soluții diluate conform indicațiilor producătorilor. Au activitate microbicidă bună, chiar în prezența materialului organic (sânge, puroi). Eficiența este maximă pentru soluțiile preparate proaspăt și scade odată cu „învechirea" preparatului. Pătează suprafețele din material plastic și obiectele din bumbac.

2. Derivații fenolici sunt stabili în diluțiile de lucru timp de 30-60 de zile.

De asemeni, au avantajul efectului fenolic rezidual și nu colorează obiectele sau suprafețele pe care sunt aplicați.

3. Hipocloritul de sodiu, preparat zilnic în diluții de la 1/10 la 1/100, are activitate antimicrobiană foarte bună, inclusiv asupra virusului hepatitei B și virusului imunodeficienței umane. Este foarte ieftin, dar are miros înțepător și poate coroda unele metale (în special aluminiul).

Aceste dezinfectante au nivel de activitate microbicidă mediu și își manifestă acțiunea în minimum 10 minute de la aplicarea pe suprafața contaminată.

Dușumeaua cabinetului trebuie acoperită cu folie de polivinil; plăcile din gresie sau faianță nu sunt recomandate deoarece pot reține, în spațiile de îmbinare, variate microorganisme. Covoarele sunt contraindicate.

Dușumeaua trebuie spălată zilnic cu apă caldă și detergent, iar în apa de clătire este adăugat un dezinfectant (de obicei, compuși de clor). Același tratament este aplicat și dușumelei din sala de așteptare, grup sanitar, laborator de tehnică dentară etc.

Notă: în cazul tratării unui pacient cu risc (ex. cunoscut ca infectat cu virusul imunodeficienței umane), toate suprafețele din cabinet, inclusiv dușumeaua, trebuie acoperite cu folii din plastic dispozabile.

Pereții cabinetului, acoperiți cu vopsea sau var lavabil, sunt decontaminați lunar, prin spălare cu apă și detergent, în cadrul curățeniei generale ce vizează și sala de așteptare, grupul sanitar ș.a.m.d.

Atenție! Echipamentul de curățenie (găleți, burete, lavete) este separat, funcție de destinație (un set pentru cabinet și un al doilea pentru anexe). La sfârșitul activității, bureții și lavetele trebuie uscate în vederea depozitării (întunericul și umezeala favorizează multiplicarea bacteriilor și a fungilor).

Figura 2. Exemple de dezinfectante pentru suprafețe (și instrumentar)

2.1.3. Dezinfecția aerului

Dezinfecția prin metode fizice poate fi realizată cu ajutorul lămpilor germicide, generatoare de radiații ultraviolete. Aproximativ 95% din radiații au lungimea de undă germicidă de 253, 7 nm. Restul de 5% este reprezentat de radiații cu lungimea de undă de 184, 9 nm, producătoare de ozon cu efect, de asemenea germicid. Timpul de acțiune indicat este de 20 de minute. Viața de funcționare a lămpilor germicide uzuale este de 100 de ore, dar scade mai repede după aprinderi frecvente. Când au fost utilizate 3/4 din timpul prevăzut, lămpile trebuie schimbate.

Dezinfecția prin metode chimice a aerului din cabinetul stomatologic este mai eficientă și mai rapidă și se realizează cu ajutorul spray-urilor ce conțin: hexilresorcinol, acid lactic sau propilenglicol. Este preferat propilenglicolul deoarece este mai puțin toxic și nu are acțiune iritantă asupra ochilor și căilor respiratorii. Toate substanțele utilizate pentru dezinfecția aerului au activitate microbicidă bună, se amestecă rapid cu aerul contaminat și rămân în suspensie un timp suficient de lung pentru exercitarea acțiunii antimicrobiene.

Dezinfecția aerului este făcută la sfârșitul zilei de lucru, după efectuarea curățeniei, aerisirea încăperilor, dezinfecția UNIT-ului și suprafețelor din cabinet și anexe.

Figura 3. Lampă bactericidă

Circuitul instrumentelor și materialelor reutilizabile în cabinetul stomatologic

Toate instrumentele utilizate în cabinetul stomatologic, indiferent dacă au venit în contact cu țesuturi lezate (manevre invazive) sau au fost utilizate numai pentru consultație, trebuie sterilizate în vederea folosirii lor la un alt pacient. Ignorarea acestei reguli nu numai că reprezintă o abatere de la etica profesională, dar lasă personalul medico-sanitar fără apărare în fața legii în cazul infectării unui sau unor pacienți pe această cale.

Alte obiecte, în afara instrumentarului, care au venit în contact cu sângele sau saliva unui pacient trebuie, de asemenea, sterilizate dacă se intenționează refolosirea lor. Pentru ca sterilizarea să fie eficientă, materialele refolosibile trebuie să parcurgă un anumit circuit ce presupune dezinfecția și curățarea lor de resturi organice, ambalarea, sterilizarea și păstrarea instrumentelor sterilizate în condiții optime care să evite decontaminarea lor între momentul sterilizării și cel al reutilizării.

2.1.4. Dezinfecția și curățarea instrumentelor

Instrumentele și alte materiale refolosibile contaminate în timpul consultației și/sau tratamentului unui pacient sunt învelite în husa dispozabilă ce a protejat masa UNIT-ului și transportate spre camera de spălare și sterilizare. Aici sunt imersate în băi de dezinfecție, diferențiat în funcție de natura lor:

• instrumentarul metalic poate fi dezinfectat cu iodofori 1% sau alcool izopropilic 70%;

• obiectele din material plastic sau cauciuc nu trebuie dezinfectate cu iodofor deoarece se pot păta; sunt recomandați derivații fenolici sau compuși de clor;

• obiectele din bumbac (e.g., câmpuri chirurgicale, măști din tifon ș.a.) sunt imersate în băi de alcool izopropilic 70%.

Materialele sunt menținute în dezinfectant între 1-3 ore, funcție de substanța utilizată (diluția de lucru și timpul de acțiune sunt indicate de producător).

Pentru toate tipurile de materiale, dezinfecția poate fi realizată cu soluții de glutaraldehidă 2% (la pH alcalin sau neutru), dar substanța este iritantă pentru conjunctivă, tegument și mucoasa respiratorie.

După dezinfecție, materialele refolosibile sunt spălate cu apă caldă și detergent, insistând cu o perie pe suprafețele neregulate ale instrumentelor. O alternativă mai eficientă și mai sigură în ce privește protecția personalului sanitar este ultrasonarea în baie de detergent, care, poate fi, însă aplicată numai pentru instrumentar.

După spălare, materialele sunt clătite la jet de apă și lăsate să se usuce la temperatura camerei. Uscarea este esențială deoarece asigură eficiența sterilizării și evită ruginirea instrumentarului metalic.

Figura 4. Exemple de dezinfectante pentru instrumentar (și suprafețe)

Spectrul de acțiune al claselor de dezinfectante (Nivven M. and all. 2013)

Substanțe	Active față de					
	Bacterii		Spori	Micro-bacterii	Virusuri	Fungi
	G+	G-				
Chlorhexidina	+++	++	–	–	+	+
Fenoli	+++	+++	–	++	+++	+++
Hipocloriți	+++	+++	++	++	+	+
Alcooli	+++	+++	+++	+++	–	–
Formaldehidă	+++	+++	+++*	+++	+++	+++
Glutaraldehidă	+++	+++	+++**	++	+++	+++
Iodofori	+++	+++	+	++	+++	+++
Compuși cuaternari de amoniu	+++	++	–	–	+	+

*	= peste +0°C
**	= peste 20°C
+++	= bun
++	= mediu
+	= slab

G= Gram

2.2. Metode de sterilizare utilizate în practica stomatologică

2.2.1. Sterilizarea la autoclav

Sterilizarea prin căldură umedă – la autoclav, cu aburi sub presiune, este metoda de elecție (dacă dispozitivul medical suportă această procedură) și se realizează la o temperatură de 121°C, timp de 30 min. și la 1 atm. Datele sunt doar orientative (la fixarea timpului se va ține cont de mărimea obiectelor, de grosimea pereților lor etc.).

Există mai multe tipuri de autoclave, dar indiferent de detaliile tehnice, ele au aproximativ același principiu de funcționare.

Există și așa numitele autoclave "flash", care se utilizează mai ales în sălile de operație, deoarece sterilizarea se efectuează la 134°C timp de 4 minute, instrumentele fiind în scurt timp utilizabile. La aceste autoclave atât aerul precum și vaporii de apă sunt îndepărtați mecanic.

Este utilizată pentru instrumentarul metalic, obiecte din bumbac sau cauciuc termorezistent. Instrumentele de sterilizat sunt grupate după destinație, împachetate în câmpuri din bumbac, hârtie, nylon sau folie de aluminiu și plasate în casolete. Dacă este utilizată folia de aluminiu, nu mai este necesară introducerea pachetelor în casolete. Unele instrumente endodontice au mânerul din metale oxidabile. Pentru a evita degradarea lor, este recomandată tratarea cu nitrit de sodiu 1-2% înainte de sterilizare.

Figura 5. Autoclav

a)

b)

Figura 6. Autoclave: a) cu încărcare orizontală și b) cu încărcare verticală

2.2.2. Sterilizarea la pupinel

Este utilizată pentru sterilizarea instrumentelor metalice, în special a celor confecționate din metale oxidabile. Există etuve concepute special pentru utilizarea în cabinetul stomatologic, dar pot fi folosite și etuvele destinate laboratoarelor sau cabinetelor medicale. Atenție, însă, temperaturi mai mari de 170°C pot duce la degradarea tăvilor port-amprente sau a punctelor de sudură ale unor instrumente. Sunt preferați următorii parametri:

- 170°C timp de 60 minute;
- 160°C timp de 120 minute;
- 150°C pentru 150 minute.

Instrumentele sunt ambalate în cutii metalice sau folie de aluminiu.

Figura 7. Pupinel (etuvă)

2.2.3. Sterilizarea prin vapori chimici nesaturați

Amestecul de formaldehidă, alcool, apă și acetonă, încălzite sub presiune degajă vapori ce acționează ca agent de sterilizare. Dispozitivul este numit chemiclav, iar parametrii de funcționare sunt: 132°C, 1.5-2 atmosfere, timp de 20 de minute. Instrumentele sunt ambalate în câmpuri din bumbac sau folie de aluminiu.

Metoda prezintă unele avantaje față de autoclavare: este mai rapidă, nu oxidează și nu corodează metalele, mai simplă ca execuție. Nu este însă indicată pentru obiecte din bumbac, cauciuc sau piese de mână autoclavabile.

2.2.4. Sterilizarea cu oxid de etilen

Poate fi utilizată pentru orice tip de material, incluzând material plastic, cauciuc, piese de mână, matrițe, lucrări protetice. Oxidul de etilen este sporicid la temperatura camerei, deci este metoda de elecție pentru sterilizarea materialului termosensibil. Ciclul de sterilizare durează între 12 și 36 ore, funcție de volumul și porozitatea obiectelor: cu cât obiectul este mai mare și țesătura mai compactă, cu atât timpul de sterilizare este mai lung.

Oxidul de etilen este toxic și are efect carcinogen supra tegumentului. Fiind un gaz inodor, există pericolul exploziilor în cazul neglijenței la manipularea dispozitivului de sterilizare.

2.2.5. Sterilizarea cu glutaraldehidă

Poate fi realizată la temperatura camerei, timpul de acțiune fiind de cca 10 ore. Dacă instrumentele de sterilizat suportă încălziri moderate, timpul de acțiune poate fi redus la 4 ore (40-50°C) sau chiar la 1 oră (60°C).

Nu necesită aparatură specială, astfel că metoda este relativ ieftină. Atenție crescută, însă, la manevrarea substanței deoarece este toxică pentru tegumente și mucoase.

2.2.6. Sterilizarea cu plasmă cu gaz

Utilizează ca agent de sterilizare în principal peroxidul de hidrogen. Reprezintă o tehnologie noua de sterilizare care se utilizează pentru sterilizarea instrumentarului care nu suportă autoclavarea.

Pregătirea materialelor pentru sterilizare

Pregătirea materialelor, a dispozitivelor, a instrumentelor și a echipamentelor medico-chirurgicale pentru sterilizare se face în spații bine precizate și dotate corespunzător, cuprinzând 6 etape distincte:

a) Decontaminarea materialelor

Se efectuează manual, imediat după utilizarea acestora (la sfârșitul oricărei operațiuni sau manevre medicale) și cât mai aproape de locul în care au fost folosite, pentru a evita pe cât posibil contaminarea mediului de spital și uscarea resturilor proteice.

Procesul de decontaminare se realizează prin imersia dispozitivelor utilizate în soluție de detergent-dezinfectant, acesta având atât o acțiune de înmuiere și detașare a murdăriei, cât și o acțiune dezinfectantă.

Recomandări:

- transportul materialelor contaminate în zona de decontaminare trebuie realizat astfel încât să se evite contaminarea mediului de spital, iar personalul medical, pacienții și vizitatorii să nu fie expuși la microorganismele localizate pe aceste articole,
- materialele și dispozitivele medicale care nu suportă imersare se vor șterge cu atenție,
- se utilizează un produs etichetat ca produs *detergent-dezinfectant pentru instrumentar*, avizat de Ministerul Sănătății, în concentrația și perioada de timp recomandată de producător, utilizându-se cuve cu capac și grătar, care să acopere spectrul de acțiune bactericid, fungicid și viruluicid (inactivarea VHB și HIV),
- temperatura soluției utilizate nu va depăși 55ºC, deoarece depășirea acestei temperaturi poate produce precipitarea proteinelor și, ca urmare, fixarea lor pe suportul tratat; Soluția decontaminantă se aruncă după utilizare.
- etapa de clătire are loc după etapa de curățare-dezinfecție, utilizându-se un jet de apă de rețea, și presupune eliminarea materiei organice și a murdăriei, precum și eliminarea oricăror urme de detergent-dezinfectant,
- întreținerea ustensilelor folosite la efectuarea pregătirii materialelor pentru sterilizare se face după fiecare operațiune de curățare, precum și la sfârșitul zilei de lucru,
- personalul care execută activitatea de curățare și dezinfecție**:**
- trebuie să poarte echipamentul de protecție adecvat,
- să cunoască riscurile la care pot fi expus,
- să respecte precauțiunile universale,
- să cunoască în orice moment denumirea dezinfectantului utilizat/ data preparării soluției de lucru/ concentrația acesteia și timpul de acțiune.

NOTĂ: Doar un obiect bine curățat va putea fi sterilizat corespunzător.

b) Uscarea

Instrumentarul, dispozitivele și părțile demontate ale acestora se vor așeza pentru scurgere pe grătare din metal, lemn sau plastic, uscarea făcându-se folosind un prosop curat, fără scame.

c) Asamblarea

Articolele care au necesitat demontarea unor componente în vederea curățării și dezinfectării lor corespunzătoare, vor fi asamblate cu grijă.

d) Lubrefierea

Constă în ungerea (vaselinizarea) instrumentarului sau a echipamentelor medicale, în special a articulațiilor și a părților mobile ale acestora.

e) Verificarea

Se verifică:

- dacă procesul de curățare a fost efectuat corect,

-integritatea instrumentarului,

-etanșeitatea și integritatea pieselor care au necesitat demontarea,

-casoletele și cutiile metalice pentru instrumentar, pentru a nu prezenta deformări, defecțiuni sau urme ale etichetărilor anterioare.

Se face apoi sortarea seturilor de instrumente în vederea împachetării lor, pentru a fi sterilizate.

f) Împachetarea

Ambalarea materialului în vederea sterilizării

Asigură prezervarea sterilității materialelor și manipularea instrumentelor și altor obiecte în conformitate cu regulile lucrului aseptic.

Există, în prezent, numeroase sisteme de ambalare: pungi, huse individuale, cutii metalice, casolete. Alegerea unui anumit tip de ambalaj depinde de: metoda de sterilizare folosită, natura materialelor, destinația obiectului în cabinetul de stomatologie, volumul mediu de lucru în cabinetul respectiv.

Operațiunile de împachetare (ambalare), în vederea sterilizării, a instrumentarului și a echipamentelor medicale, după ce acestea au fost sortate, se vor efectua pe o suprafață curată, destinată special acestui scop.

Împachetarea se poate face în:

- *hârtie specială* pentru împachetarea instrumentarului sau a materialului textil (pentru sterilizarea cu abur sub presiune), obligatoriu în doua straturi, astfel încât materialul de sterilizat să fie bine închis, fără soluții de continuitate; după plierea celui de al doilea strat acesta se închide cu bandă adezivă cu indicator fizico-chimic de virare a culorii;

- *pungi / role hârtie plastic* fabricate special se utilizează pentru:
  - sterilizarea cu aer cald sau cu oxid de etilenă, având indicatori fizico-chimici de temperatură;
  - sterilizarea cu abur sub presiune, având indicatori fizico-chimici de temperatură.

Figura 8. Instrumentar ambalat

Materialul ambalat în hârtie specială sau pungi hârtie / plastic se așază în coșuri / navete metalice. După ce a fost încărcat cu instrumentar (truse) sau material textil (pentru o procedură) și indicator fizico-chimic „integrator" pungile trebuie sudate/lipite la capătul de acces. Coșurile /navetele metalice astfel încărcate se introduc în incinta sterilizatorului.

Este interzisă reutilizarea hârtiei speciale și a pungilor hârtie plastic pentru ambalarea materialelor în vederea sterilizării.

- *cutii metalice* (pentru sterilizarea cu aer cald)
- *cutii metalice perforate* (pentru sterilizarea cu abur sub presiune)
- *casolete perforate cu colier* (pentru sterilizarea cu abur sub presiune).

În cutiile metalice perforate sau cele cu colier se introduce materialul de sterilizat și indicatorii fizico-chimici adecvați, pentru controlul eficacității sterilizării, apoi se închide capacul. Se lipește banda adezivă cu indicator chimic în vederea fixării capacului.

Se vor utiliza numai cutii metalice perforate sau casolete perforate cu colier în perfectă stare (nedeformate, capacul să se închidă etanș, colierul să se muleze perfect pe corpul casoletei). Este interzisă utilizarea cutiilor metalice neperforate pentru sterilizarea la autoclav.

Durata de valabilitate a materialelor sterile, în condițiile păstrării lor corespunzătoare, este următoarea:

- *cutii metalice perforate sau casolete cu colier* - 24 de ore de la sterilizare, cu condiția menținerii cutiilor și a casoletelor închise.

- *materialele ambalate în pungi hârtie-plastic sudate* - 2 luni de la sterilizare, cu condiția menținerii integrității ambalajului (cu excepția celor pentru care producătorul specifică o altă perioadă de valabilitate, cu condiția menținerii condițiilor specificate de acesta).

Dispozitivele medicale și materialele sterilizate se etichetează notându-se data, ora, sterilizatorul cu aer cald la care s-a efectuat sterilizarea și persoana care a efectuat sterilizarea.

2.3. Controlul sterilizării

Controlul sterilizării la autoclav se efectuează:

1. cu testul de verificare a penetrării aburului (testul Bowie & Dick);
2. cu indicatorii fizico-chimici;
3. cu indicatorii biologici.

1. Testul de verificare a penetrării aburului

Testul de verificare a penetrării aburului, respectiv testul Bowie & Dick (de unică folosință), pentru autoclav este obligatoriu, alături de indicatorii fizico-chimici și biologici. Acesta, numit și test dinamic de eliminare a aerului este un test foarte sensibil folosit pentru evidențierea aerului rezidual periculos sau a gazelor inerte din camera de sterilizare. Prezența acestora împiedică pătrunderea corespunzătoare a aburului în zonele respective, ceea ce duce la periclitarea procesului de sterilizare. Cerneala indicatoare își schimbă culoarea din albastru în verde închis spre negru, atunci când este expusă anumitor parametri de sterili- zare. Schimbarea culorii este completă și uniformă.

Notă: Evacuarea insuficientă a aerului/gazelor inerte va conduce la o schimbare neuniformă a culorii.

Figura 9: test Bowie-Dick

2. Indicatori fizico-chimici

Indicatorii fizico-chimici pentru controlul sterilizării se prezintă în mai multe forme: bandelete, bandă adezivă cu indicatori, pungi cu markeri de culoare și etichete indicatoare.

Indicatorii fizico-chimici se plasează în fiecare pachet / casoleta și se verifică la deschiderea fiecărui pachet sterilizat.

Se vor verifica indicatorii de eficiență ai sterilizării:

- virarea culorii la benzile adezive cu indicator fizico-chimic;

- virarea culorii la indicatorii fizico-chimici „integratori"; se poate verifica pentru materialele ambalate în pungi hârtie plastic prin transparența plasticului. Pentru materialele ambalate în cutii metalice, verificarea se face de către utilizatori, la deschiderea acestora. În situația în care virajul nu s-a realizat, materialul se consideră nesterilizat și nu se utilizează.

Simpla virare a indicatorului fizico-chimic nu garantează o sterilizare corectă, folosirea acestui indicator nefiind suficientă pentru un control eficient al sterilizării.

În Registrul de evidență a sterilizării se notează: data și numărul aparatului de sterilizare (atunci când sunt mai multe), conținutul pachetelor din șarja și numărul lor, numărul șarjei, temperatura și presiunea la care s-a efectuat sterilizarea, ora de începere și de încheiere a ciclului (durata), rezultatele indicatorilor fizico-chimici, semnătura persoanei responsabile cu sterilizarea și care eliberează materialul steril; în situația în care se efectuează înregistrarea automată se atașează diagrama ciclului de sterilizare, observații, data la care s-au efectuat întreținerea și verificarea aparatului.

Figura 10. Bandă indicatoare pentru pupinel și autoclav

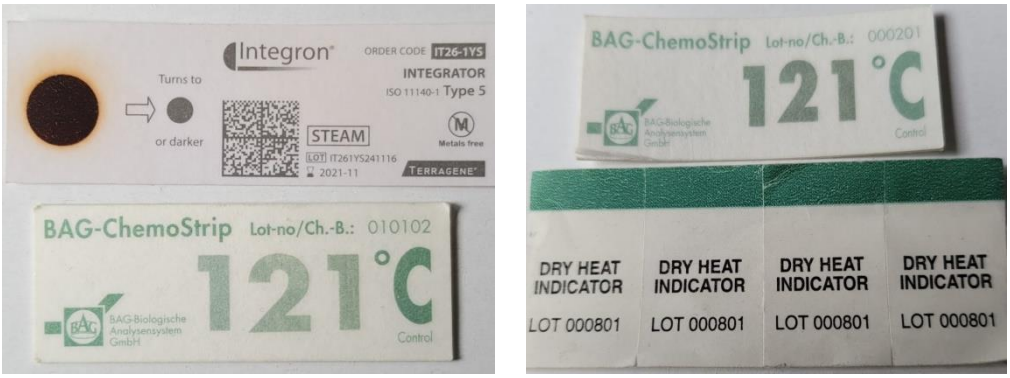


Figura 11: bandelete adezive pentru pupinel și autoclave

3. Indicatori biologici

Indicatorii biologici constau în teste biologice pentru controlul eficacității sterilizării care conțin spori din familia *Bacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) și *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™), care se prezintă sub formă de:

– fiole de plastic termorezistent ce au în interior un strip impregnat *cu Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) pentru sterilizarea la autoclav;

– fiole de plastic care au în interior un strip impregnat cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) pentru sterilizarea cu plasmă;

– strip impregnat cu *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™) (denumire veche *Bacillus subtilis*) pentru sterilizarea cu aer cald (etuvă, pupinel) și sterili- zarea cu oxid de etilenă.

A) Efectuarea controlului bacteriologic al sterilizării la autoclav:

- se utilizează indicator biologic cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™). Acesta indică îndeplinirea tuturor condițiilor pentru efectuarea corectă a sterilizării (temperatură, presiune, timp). Un ciclu de sterilizare corect se efectuează la temperaturi de 121-134°C.

- indicatorul biologic se introduce într-un ciclu normal de sterilizare, așezându-se în locul cel mai greu accesibil al autoclavului.

- la terminarea procesului de sterilizare fiola se lasă 10 minute să se răcească, pentru a evita riscul spargerii ei.

Figura 12: Indicator biologic cu *Geobacillus Stearothermophilus*

B) Efectuarea controlului bacteriologic al sterilizării cu căldură uscată (etuvă / pupinel) se efectuează:

- se utilizează indicatori biologici impregnați cu *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™), preparați industrial, care conțin 10^6 UFC,

- se plasează cel puțin 2 indicatori biologici în fiecare șarjă verificată, cel puțin o dată pe săptămână; se realizează ciclul complet de sterilizare,

- indicatorii biologici pozitivi (cu creștere bacteriană), după înregistrare vor fi sterilizați în maximum 24 de ore de la pozitivarea lor.

Acestea sunt normele și metodele aflate în vigoare în țara noastră. În alte state se utilizează și alte metode de sterilizare (sterilizarea cu radiații gamma emise de Co radioactiv, sterilizarea cu ozon, cu vapori de formaldehidă etc.).

Figura 13. Indicator biologic cu *Bacillus atrophaeus*

Figura 14. Incubator pentru indicatori biologici

Alegerea metodei de dezinfecție și/sau sterilizare pentru suprafețe, instrumentar și echipamente trebuie să țină cont de categoria din care acestea fac parte: noncritice, semicritice și critice.

Suprafețele, instrumentarul și echipamentele sunt clasificate **după cum urmează:**

Critice - cele care vin în contact cu țesuturile corpului uman sau penetrează țesuturile, inclusiv sistemul vascular, în mod normal sterile. Aceste dispozitive trebuie sterilizate.

Exemple: instrumentarul chirurgical, inclusiv instrumentarul stomatologic, materialul utilizat pentru suturi, echipamentul personalului din sălile de operații, câmpuri operatorii, mesele și tampoanele, tuburile de dren, implanturile, acele și seringile

Semicritice - care vin în contact cu mucoase intacte și nu penetrează bariera tegumentară, cu excepția mucoasei periodontale sau pielea având soluții de continuitate. Acestea ar trebui să beneficieze de cel puțin dezinfecție la nivel mediu.

Exemple: endoscoapele flexibile și rigide utilizate exclusiv ca dispozitive pentru imagistică, laringoscoapele, tuburile endotraheale, echipamentul de anestezie și respirație asistată.

Noncritice - care nu vin frecvent în contact cu pacientul sau care vin în contact numai cu pielea intacta a acestuia. Aceste dispozitive trebuie să fie curățate și trebuie aplicată o dezinfecție scăzută.

Exemple: stetoscoape, manșeta de la tensiometru, dispozitive medicale care sunt atinse și de personalul medical în timpul procedurii, orice alte tipuri de suporturi.

Suprafețele inerte, cum sunt pavimentele, pereții, mobilierul de spital, obiectele sanitare s.a., se încadrează în categoria noncritice.

Rezistența germenilor la substanțele germicide, în ordine descrescătoare, este următoarea:

- spori bacterieni
- micobacterii
- virusuri neanvelopate și mici
- fungi
- forme vegetative ale bacteriilor
- virusuri anvelopate sau de mărime medie.

2.4. Dezinfecția mâinilor

Spălarea mâinilor face parte din **Precauțiile Standard** și se aplică pentru tot personalul medico-sanitar, administrativ, pacienți.

Mâinile constituie principala cale de transmitere pentru numeroși agenți patogeni de la un pacient la altul, de la personalul de îngrijire la pacient, cât și de la pacient la personalul de îngrijire. Igiena mâinilor trebuie considerată a fi cea mai importantă procedură de reducere a transmiterii microorganismelor.

Mâinile dețin atât o floră microbiană rezidentă, cât și una tranzitorie.

- ***Flora microbiană rezidentă,*** reprezentată de microorganisme saprofite, nepatogene, ce constituie flora normală a tegumentului, fiind protectivă și mai puțin incriminată în infecțiile asociate asistenței medicale, însă poate contamina cavitățile sterile (ochiul și tegumentele lezate).

- ***Flora microbiană tranzitorie*** rezultă prin contaminarea ocazională a mâinilor cu microorganisme, în special din mediul spitalicesc, ce pot coloniza epiderma o perioadă limitată de timp. Cauzează frecvent patologie nosocomială datorită transmiterii accidentale, prin contact direct cu pacientul sau indirect, prin intermediul unor mijloace diverse: suprafețe, obiecte, materiale, instrumentar, dispozitive și aparatură medicală, fluide, alimente etc.

Procedurile recomandate pentru dezinfecția mâinilor, în funcție de nivelul de risc cerut de activitatea sau operațiunea ce urmează a fi efectuată (conform Ordinului M.S. nr. 961/2016):

Tabel nr. 2. Tipuri de proceduri si indicații pentru dezinfecția mâinilor

Nivelul de	Proceduri aplicate	Indicații
Minim	- spălarea simplă igienică a mâinilor cu apă și săpun lichid	- când mâinile sunt vizibil murdare - la începutul și la sfârșitul programului de lucru - înainte și după utilizarea mănușilor (sterile sau nesterile) - înainte și după activitățile de curățare - înainte și după contactul cu pacienții - după utilizarea grupului sanitar (WC)
Intermediar	- spălare cu apă și săpun lichid, urmată de dezinfecția igienică a mâinilor prin frecare cu un antiseptic, de regulă pe bază de alcooli SAU - dezinfecția igienică a mâinilor prin spălare cu apă și săpun antiseptic	- după contactul cu un pacient septic izolat - înainte de realizarea unei proceduri invazive - după orice contact accidental cu sângele sau cu alte lichide biologice - după contactul cu un pacient infectat și/sau cu obiectele din salonul acestuia - după toate manevrele potențial contaminante - înainte de contactul cu un pacient izolat profilactic - înaintea manipulării dispozitivelor intravasculare, tuburilor de dren pleurale sau similare - între manevrele efectuate succesiv la același pacient - înainte și după îngrijirea plăgilor
Înalt	- dezinfecția chirurgicală a mâinilor prin frecare cu antiseptic pe bază de alcooli, după spălarea prealabilă cu apă sterilă și săpun antiseptic	- înainte de toate intervențiile chirurgicale, obstetricale - înaintea tuturor manevrelor care necesită o asepsie de tip chirurgical

Igiena mâinilor este un indicator de siguranță și de calitate a îngrijirilor medicale!!!

OMS recomandă curățirea mâinilor personalului medical în următoarele circumstanțe:

► înainte de a atinge pacientul,

► înaintea procedurilor curate/aseptice,

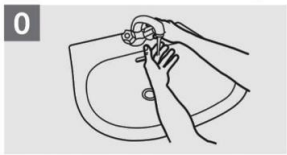
► după expunerea la fluide ale pacientului,

► după atingerea pacientului,

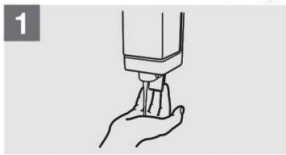
► după atingerea suprafețelor adiacente pacientului.

CUM SPĂLĂM MÂINILE?

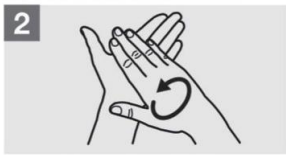
Durata întregii proceduri: cel puțin 30 de secunde!



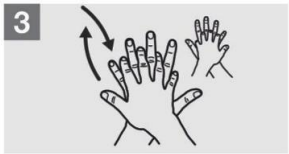
Udați mâinile cu apă.



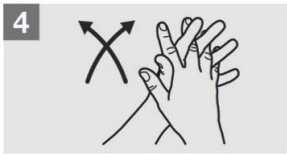
Aplicați săpun suficient pentru a acoperii toată suprafața mâinilor.



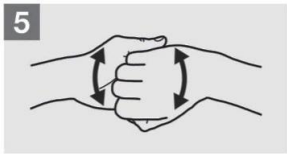
Frecați mâinile, palmă peste palmă.



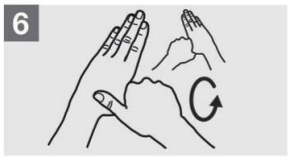
Palma dreaptă peste dosul palmei stângi cu degetele încrucișate și invers.



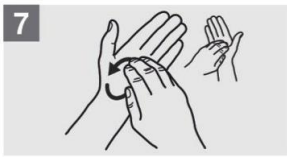
Palmă peste palmă, cu degetele încruciate.



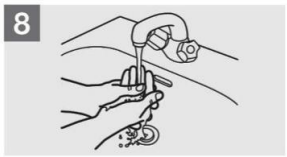
Dosul degetelor pe palma opusă.



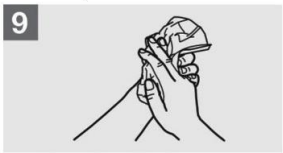
Frecări rotative cu degetul mare stâng prins în palma dreaptă și invers.



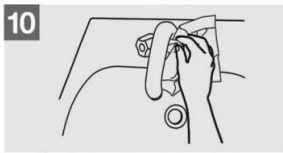
Frecări rotative într-un sens și celălalt cu degetele împreunate ale mâinii drepte pe palma stângă și invers.



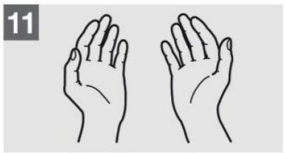
Clătiți mâinile cu apă.



Uscați mâinile cu un prosop de unică folosință.



Închideți robinetul folosind un prosop.



Odată uscate, procedura de spălare este terminată.

În conformitate cu recomandările:

World Health Organization

Ministerul Sanatatii

INSP Institutul National de Sanatate Publica

CNEPSS Centrul National de Evaluare si Promovare a Starii de Sanatate

Cum dezinfectam mainile?

O BUNA IGIENA IMPLICA DEZINFECTIA! IN PREALABIL, SPALATI MAINILE DACA SUNT VIZIBIL MURDARE

Durata intregii proceduri: 20-30 secunde

Aplicati produsul dezinfectant in palma acoperind toata suprafata.

Frecati mainile palma peste palma.

Palma dreapta peste cea stanga cu impletirea degetelor si vice versa.

Palma peste palma cu degetele impletite.

Dosul degetelor pe palma opusa cu degetele impreunate.

Frecari rotative cu degetul mare stang prins in palma dreapta si vice versa.

Frecari rotative intr-un sens si celalalt cu degetele impreunate ale mainii dreapte, pe palma stanga si vice versa.

Odata uscate, mainile sunt dezinfectate.

World Health Organization

Ministerul Sanatatii

INSP Institutul National de Sanatate Publica

CNEPSS Centrul National de Evaluare si Promovare a Starii de Sanatate

3. Medii de cultură

Mediile de cultură sunt utilizate în microbiologie pentru cultivarea bacteriilor, astfel încât să poată fi identificate microorganismele și apoi testată sensibilitatea acestora la chimioterapicele antiinfecțioase.

Pentru cultivarea microorganismelor (creșterea *in vitro*, în condiții artificiale) sunt necesare substraturi numite medii de cultură pe care microorganismele realizează toate procesele vitale. Sunt substanțe care asigură nutrienții și condiții fizico-chimice necesare creșterii și multiplicării.

Mediile de cultură ideale trebuie:

1. Să asigure bacteriilor condiții de dezvoltare cât mai apropiate celor din mediul lor natural (organismul uman)
2. Să nu conțină substanțe inhibitoare pentru bacteriile care se dorește a fi izolate
3. Să faciliteze observarea apariției și dezvoltării culturii
4. Să faciliteze izolarea bacteriilor în cultură pură (pH, presiune osmotică)
5. Să fie sterile

Se apelează la producători industriali pentru:

● **Medii deshidratate,** care necesită numai adăugarea de apă distilată pentru reconstituire și sterilizarea în vederea utilizării. În această situație o parte din responsabilitatea controlului de calitate revine producătorului.

● **Medii deshidratate cu aditivi,** în cazul cărora pentru germeni mai pretențioși se adaugă un supliment în momentul preparării mediului (sânge defibrinat de berbec, factori de creștere, amestecuri selective)

● **Medii preparate solide**, necesită topirea și turnarea în laborator.

Metoda de preparare

Toate mediile deshidratate trebuie reconstituite cu apă distilată sau de-ionizată. Cele mai bune rezultate se obțin prin adăugarea lentă a pulberii în apă pentru a evita formarea de agregate. Mediile care conțin agar trebuie rehidratate și apoi aduse la fierbere timp de 1 minut. Fierberea dizolvă agarul. Timpul și temperatura de sterilizare trebuie respectate conform indicațiilor producătorului sau rețetei fiecărui mediu. Rețeta și modul de preparare sunt inscripționate pe fiecare flacon cu mediu de cultură deshidratat.

La mediile deshidratate care necesită adaos de sânge berbec (MHA, GS), sângele se adaugă în proporție de 5-10%.

La fiecare lot de mediu se va verifica pH-ul. PH-ul mediului trebuie să fie între 7,2 și 7,4 la temperatura camerei. Corecția pH-lui se va face cu soluții tampon de NaOH 10% sau HCl 20%.

Mediile trebuie distribuite cu grijă și în condiții aseptice, în plăci Petri sau eprubete sterile. Mediile proaspăt turnate au valabilitate 7 zile la o temperatură de păstrare de 2-8 ºC.

Medii gata preparate

Sunt medii la care controlul de calitate revine în cea mai mare parte producătorului.

Geloza Columbia pentru preparare geloză-sânge, geloză chocolat, Muller-Hinton, livrate în flacoane de diferite volume, se topesc în baie de apă și se distribuie aseptic în plăci Petri sau eprubete sterile. Aceste medii trebuie retestate înainte de utilizare pentru a evita orice eroare de contaminare. Loturile primite trebuie analizate macroscopic și trebuie semnalată furnizorului orice deteriorare a ambalajului care ar face posibilă contaminarea, orice modificări ale culorii sau clarității, comparativ cu loturile anterioare, contaminarea vizibilă, ori deshidratarea sau umiditatea excesivă a mediilor agarizate.

Medii gata de utilizare

Aceste medii sunt gata de utilizare (turnate în plăci), livrate de furnizor însoțite de certificate de calitate, instrucțiuni de depozitare și utilizare.

Ingredientul de bază al mediilor de cultura este geloza. Agar-agarul este un produs organic extras din alge marine – alge roșii (agarofite). Este utilizat la prepararea mediilor de cultură pentru că asigură solidificarea lor. Creșterea bacteriilor nu distruge structura mediului deoarece cele mai multe bacterii sunt incapabile sa utilizeze agarul pentru metabolism. Agarul se comercializează sub formă de pulbere, care în amestec cu apa și încălzit la 100 °C rămâne lichid, iar pe măsură ce se răcește la 40 °C se gelifică. Mediul cu agar este un mediu relativ inert. Alte ingrediente, nutrienți, factori de creștere, indicatori de pH sunt adăugați în mediul cu agar.

Figura 15. Agar- agar

Clasificarea mediilor de cultură pe baza stării fizice:

• medii lichide

• medii semisolide

• medii solide

Mediile lichide – bulioane

Prelevatele necontaminate (ex. sânge, exsudate din seroase), se izolează pe aceste medii lichide. Cultura poate fi inițiată de un număr redus de bacterii, volumul prelevatului însămânțat poate fi crescut. Prin diluție neutralizează factori antimicrobieni din prelevatul examinat.

Figura 16. Mediu lichid simplu – bulion

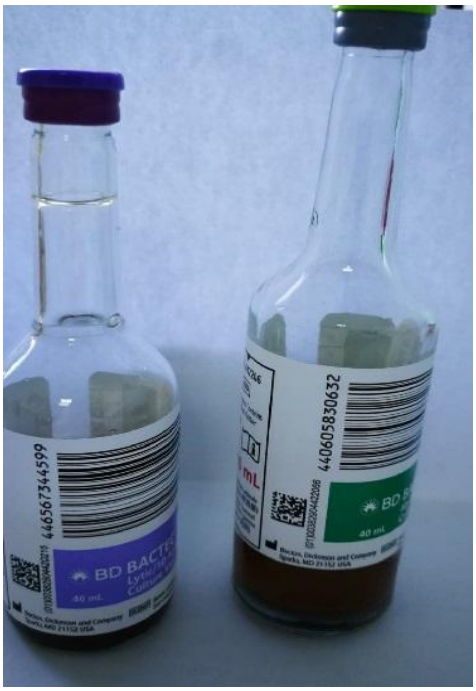


Figura 17. Mediu lichid - flacoane BD **BACTEC**

Mediile solide se împart în:

1. neselective
2. diferențiale
3. selective

1. Medii neselective:

Cel mai utilizat mediu neselectiv este geloza sânge cu 5% sânge de berbec – pe care se însămânțează prelevatele necontaminate dar și cele contaminate (exudate din căile respiratorii, puroi, exudat conjunctival).

2. Medii diferențiale: conțin substratul pentru o anumită enzimă sau citotoxină bacteriană și un indicator de pH.

Exemple:

● geloza – sânge: diferențiază bacteriile hemolitice de cele nehemolitice

● mediile lactozate care conțin diverși indicatori de pH, diferențiază enterobacteriile care fermentează lactoza (lactozo-pozitive) de cele care nu fermentează lactoza (lactozo-negative).

3. Medii selective: sunt medii de cultură care conțin substanțe care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare din produsele patologice prelevate.

Pentru izolarea enterobacteriilor din prelevate contaminate există o diversitate de medii selective:

• mediul Mac Conkey - slab selectiv care conține ca agenți inhibitori săruri biliare și cristal violet

• mediul Levin care conține ca agenți inhibitori eozina și albastru de metilen. Este tot un mediu de cultură slab selectiv.

Aceste medii inhibă creșterea bacteriile Gram pozitive.

■ mediul ADCL (Agar Dezoxicholat Citrat Lactoza) – mediu moderat selectiv

■ mediul XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar) – mediu moderat selectiv

■ mediul Istrati – Meitert– mediu moderat selectiv ADCL, XLD agar și Istrati-Meitert inhibă bacteriile Gram pozitive și o parte din bacilii Gram negativi comensali.

■ mediul Wilson – Blair - mediu înalt selectiv care conține verde briliant ca și agent inhibitor, determinând inhibarea unei game largi de bacterii pentru a facilita izolarea salmonelelor

■ mediul Löwenstein – Jensen pentru izolarea *Mycobacterium tuberculosis*

■ mediul Chapman solid cu 7,5% NaCl pentru izolarea stafilococilor

■ mediul Sabouraud pentru cultivarea fungilor

■ mediul Tinsdal pentru izolarea *Corynebacterium diphteriae*

Agarul - sânge poate fi făcut selectiv pentru izolarea unor patogeni pretențioși nutritiv prin adaos de antibiotic.

Mediile de îmbogățire sunt medii de cultură lichide.

- bulion cu selenit acid de Na: preincubarea materiilor fecale 18 h la 37°C în acest mediu, favorizează izolarea salmonelelor.
- mediul Chapman lichid cu 15% NaCl pentru stafilococi
- apa peptonată cu pH= 8,5 pentru *Vibrio cholerae*
- mediul OCST pentru *Corynebacterium diphteriae*

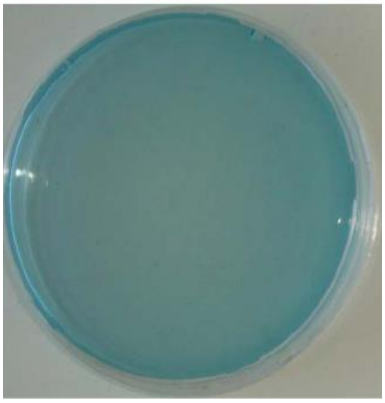


Figura 18: medii de cultură solide

Mediile de transport conțin substanțe care inhibă creșterea tuturor speciilor timp de 24 de ore, necesare transportului produselor patologice prelevate la laboratorul de microbiologie. Exemple:

● tampoane cu mediu de transport AMIES care mențin viabile bacteriile aerobe, facultativ anaerobe și anaerobe pentru minim 48 de ore la temperatura camerei sau a frigiderului.

● tampoane cu mediu de transport STUART care permit conservarea și transportul unui mare număr de microorganisme patogene cum ar fi *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningiditis*, *Bordetella pertusis*, *Corynebacterium diphteriae*, *Trichomonas vaginalis*, *Streptococcus spp*., *Salmonella spp*., *Shigella spp*. Germenii pretențioși rămân viabili în acest mediu 24 ore, iar ceilalți germeni, câteva zile.

a)

b)

Figura 19. Tampoane cu mediu de transport a) Amies și b) Stuart

Mediile pentru teste biochimice conțin un singur substrat – zahăr sau aminoacid, la care se adaugă sau nu, indicator colorimetric de pH. (ex.:TSI – triple sugar iron).

Figura 20. Medii pentru teste biochimice

4. Etapele diagnosticului bacteriologic: recoltare, examen macroscopic și microscopic, izolarea și identificarea bacteriilor din produsele patologice

Identificarea microorganismelor care cauzează boli, stabilirea celor responsabile pentru o anumită boală sau condiție (purtător sănătos), recomandarea unui tratament sau a unei strategii de tratament în baza acestora sunt aspecte ale microbiologiei clinice.

Etapele diagnosticului microbiologic sunt următoarele:

1. Diagnostic bacteriologic urmărește detectarea agentului patogen, a componentelor lui sau a unui produs (ex. toxină) în prelevate de la bolnav sau din mediul extern. Se realizează pe parcursul a 48-72 de ore în cazul bacteriilor izolate din produse patologice sau un interval de timp mai lung pentru fungi sau infecții cu micobacterii. De asemenea diagnosticul unei hemoculturi este la 72 de ore, când se raportează rezultatul intermediar și la 7 zile rezultatul final.

ZIUA 1

4.1. Recoltarea produselor patologice

Pentru a obține un rezultat corect se impune respectarea următoarelor reguli preanalitice:

• prelevarea să se facă cât mai aproape de debutul bolii,

• recoltarea să se facă înainte de instituirea tratamentului antimicrobian,

• prelevarea să se facă în condiții stricte de asepsie (luând toate măsurile de antisepsie), utilizând recipiente sterile pentru a preveni contaminarea pro- duselor (se indică utilizarea recipientelor tipizate, ex: urocultor, tampon recoltare, eprubete);

• recoltarea să fie corect efectuată de către pacient sau personalul medical, pentru a preîntâmpina contaminarea în timpul recoltării

• să se preleve un anumit produs / produse, în funcție de manifestarea clinică

• produsul să fie corect etichetat si transportat la laborator în condiții corespunzătoare.

Recoltarea este unul din punctele de întâlnire dintre clinică și laboratorul de microbiologie. **Dacă recoltarea nu este corectă, nici o tehnică de laborator nu va putea îndrepta această eroare. Greșelile de recoltare sunt cele mai frecvente cauze ale nereușitei diagnosticului microbiologic sau, mai grav, ale unui diagnostic eronat.**

De aceea trebuie să se cunoască:

• care este produsul biologic în care se pot găsi bacteriile suspecte în funcție de etapa clinică de evoluție a bolii;

• care este *momentul optim* de recoltare în timpul zilei;

• dacă proba este în mod normal sterilă sau prezintă floră normală;

• care este *procedeul cel mai corect de recoltare* pentru a se evita contaminarea probei cu germeni din mediul extern. Instrumentele cu care se face recoltarea și recipientele în care se introduce proba trebuie să fie sterile;

• care este *cantitatea necesară* din fiecare probă;

• *cum trebuie ambalat* acel produs pentru a-i feri de contaminare pe cei care îl manipulează;

• care este *timpul optim* de transport la laborator *pentru a fi prelucrat;*

• care sunt *procedeele de conservare* ale probelor când acestea nu pot fi trimise imediat la laborator;

Produsele biologice vor fi însoțite obligatoriu de buletinul de analiză care trebuie să cuprindă toate informațiile necesare.

4.1.1. Recoltarea exudatului inflamator din crevasele gingivale sau pungile parodontale

Exsudatul inflamator din crevasele gingivale sau punga parodontalâ (când este deja formată) se recoltează după îndepărtarea plăcii bacteriene supragingivale.

Când punga parodontală lipsește și există doar detașarea gingiei marginale, prelevarea se face cu ajutorul conurilor din hârtie de filtru sterile, care sunt introduse cu blândețe în sulcusul gingival și sunt menținute cca 1 minut. Apoi, sunt retrase cu grijă din cavitatea orală și introduse în tuburi cu mediu de transport reducător fluid (ex. bulion thioglicolat) pentru a asigura viabilitatea bacteriilor anaerobe și microaerofile.

Când este prezentă punga parodontală, este prelevat conținutul acesteia cu ajutorul unei chiurete sterile. Punga chiuretată este introdusă într-un tub cu mediu de transport reducător.

4.1.2. Recoltarea produselor patologice din cadrul infecțiilor pulpare

Se izolează dintele interesat cu o digă sterilă, din cauciuc autoclavabil; dacă dintele are cavitate carioasă importantă sau fractură coronară, se înlocuiește diga cu rulouri din vată, sterile.

Se antiseptizează suprafața externă a dintelui vizat, dar și dinții adiacenți, folosind: apă oxigenată 3%, iodofor, alcool izopropilic 50%.

Se îndepărtează dentina cariată și se creează acces spre camera pulpară.

Se inseră în canalele radiculare deschise conuri sterile din hârtie de filtru, cât mai profund, spre apexul dintelui. Alternativ, pot fi folosite ace Miller meșate cu vată, sterile.

Se mențin conurile, respectiv acele meșate, în canale cca 2 minute, apoi se retrag cu grijă, pentru a evita contaminarea prelevatelor cu flora orală.

Se imersează conurile/acele în medii de cultură lichide: bulion infuzie cord-creier pentru bacteriile aerobe și facultative și bulion thioglicolat pentru bacteriile anaerobe. Manipularea conurilor/ acelor se face cu o pensă sterilă.

Se incubează tuburile astfel însămânțate la 37°C pentru 48-72 ore, chiar 96 de ore în cazul mediilor pentru anaerobi.

Figura 21. Ac Miller

Figura 22. Conuri de hârtie

4.1.3. Recoltarea puroiului din abcesele periapicale

Prelevarea puroiului este făcută prin aspirație cu ac și seringă sterile, după antiseptizarea regiunii cu alcool etilic sau alcool izopropilic 50%.

Deoarece principalele bacterii implicate sunt anaerobe, este recomandat sistemul „seringă anaerobă”. Alternativ, produsul poate fi descărcat imediat după prelevare într-un mediu de transport reducător.

4.1.4. Recoltarea puroiului în cazul diverselor afecțiuni din sfera orofacială

Puroiul reprezintă un lichid vâscos format din leucocite întregi sau alterate, microorganisme, resturi celulare și fibrină.

- din colecții purulente închise recoltarea se face prin aspirarea cu o seringă cu ac fin (cel mai frecvent de către chirurg când acesta deschide colecția), după o prealabilă antisepsie a tegumentelor și transferarea produsului într-un recipient steril cu mediu de transport (care poate asigura și condiții de anaerobioză); nu se recoltează puroiul de la suprafața colecției deoarece acesta conține bacterii moarte. După toaleta plăgii se recoltează serozitate din profunzimea ei. Transportul către laboratorul de specialitate trebuie realizat în intervalul maxim de 1 oră;

- din colecții purulente deschise recoltarea se poate efectua și în laborator. Se realizează prin ștergerea în prealabil a exudatului de la suprafață cu ser fiziologic steril și introducerea tamponului steril profund în leziune, după care este inserat în tubul cu mediul de transport Amies. În cazul colecțiilor purulente fistulizate se efectuează dezinfecția tegumentului cu tinctură de iod. Se introduce pipeta Pasteur pe traiectul fistulei și se aspiră.

Secreția de plagă se recoltează astfel: după o prealabilă toaletă a plăgii cu ser fiziologic steril, se șterge plaga în profunzime cu tamponul steril, se învârte vârful timp de 5 secunde pe o arie de 1 cm^2, suficient de ferm pentru a provoca o ușoară sângerare; se introduce tamponul în tubul cu mediu de transport și se trimite spre laborator în maxim 1 oră.

4.1.5. Recoltarea secreției nazale (exudatul nazal)

Recoltarea se realizează cu un tampon steril (câte un tampon pentru fiecare cavitate nazală în parte.

Tehnica de recoltare: capul pacientului este în extensie, tamponul este introdus per-nazal cu blândețe de-a lungul planșeului nazal până atinge peretele posterior al nazo-faringelui. Tamponul este reintrodus în tubul protector și se trimite imediat la laborator sau se introduce în geluri/lichide conservante (mediu Amies, Stuart) până la prelucrare.

4.1.6. Recoltarea secreției faringiene (exudatul faringian)

Recoltarea se face cu un tampon steril. Momentul recoltării este fie dimineața pe nemâncate, înainte de toaleta cavității bucale, pentru a nu diminua flora bacteriană prin acțiunea de curățire mecanică a mucoaselor prin toaleta cavității bucale sau în timpul alimentației, fie la 3-4 ore după toaleta cavității bucale, gargarisme cu antiseptice sau ingestia de alimente.

Tehnica de recoltare: pacientul este așezat cu gâtul în ușoară extensie, cavitatea bucală deschisă la maximum, faringele bine expus prin iluminare, baza limbii (fața dorsală) deprimată cu o spatulă (apăsător de limbă) sterilă. Bolnavul este invitat să

pronunțe tare vocala A. Tamponul se introduce fără a atinge limba și palatul (pentru a nu contamina proba cu flora bucală) și mai ales lueta (pentru a nu declanșa reflexul de vomă). Se tamponează ferm, printr-o mișcare circulară și se șterge suprafața amigdalelor, peretele posterior al faringelui precum și orice zonă inflamată, ulcerată sau cu depozite purulente. Tamponul este scos cu precauție, se reintroduce în tubul protector și se trimite imediat la laborator sau se introduce în mediu de transport până la prelucrare.

4.1.7. Recoltarea secreției din șancru

La pacienții cu sifilis, leziunea se curăță cu un tampon steril și ser fiziologic, se apasă între degete șancrul și se aspiră serozitatea cu o pipetă Pasteur. Se efectuează un preparat nativ, între lamă și lamelă, ce se va examina la microscopul cu contrast de fază sau cu fond întunecat. Secreția se poate stimula prin acoperirea șancrului cu eter prin evaporarea acestuia.

4.1.8. Recoltarea sângelui

În mod normal, sângele este steril. Ca produs patologic, acesta poate fi recoltat pentru examen bacteriologic sau pentru examen serologic.

a. Pentru examenul bacteriologic se efectuează hemocultura, care stabilește prezența bacteriilor în sânge prin însămânțarea unei probe de sânge într-un mediu de cultură adecvat. Este indicată în cazul pacienților cu suspiciune de septicemie/bacteriemie, cu sindrom febril prelungit/sindrom infecțios sever, afecțiuni valvulare, febra de cauză neprecizată, etc.

Timpul optim de recoltare este imediat ce frisonul și-a făcut apariția (adică la 1-2 ore de la pătrunderea bacteriilor în sânge, după care acestea încep să se multiplice).

Tehnica:

– antiseptizarea tegumentelor cu o soluție de alcool și chlorhexidină,

– după puncția venoasă - se însămânțează sângele imediat pe: 3 seturi de flacoane (de tip BACTALERT® sau BACTEC®), care conțin medii de cultură lichide pentru bacterii aerobe, anaerobe și fungi,

– cu asigurarea unui raport adecvat sânge/mediu (1/10-1/5), adică 5- 10 ml sânge venos la 50 ml mediu lichid de cultură (raport optim pentru dilua- rea sângelui și împiedicarea activității factorilor antimicrobieni naturali)

– înainte de inițierea antibioterapiei!!!!

b. În cadrul examenului serologic se urmărește punerea în evidență a anti-corpilor din serul de cercetat. În acest scop se recoltează 10 ml de sânge integral într-un recipient steril și se lasă la temperatura camerei timp de 1-2 ore pentru depunerea cheagului de sânge deasupra rămânând plasma. Plasma se decantează într-un recipient steril și este apoi centrifugată obținând serul din care se fac teste pentru diagnosticul serologic.

4.1.9. Recoltarea urinii

Se realizează pentru urocultură în vederea evidențierii microorganismelor patogene. Recoltarea se face identic la bărbați și femei.

Prelevările uzuale constau în:

- Proba "curată prinsă în zbor" din jetul mijlociu, indicată pentru diagnosticul infecțiilor tractului urinar (ITU) cu bacterii condiționat patogene. În primul rând se recomandă o toaletă locală a organelor genitale externe ce constă din spălarea cu apă și săpun a vulvei la femei și a glandului la bărbați. Nu se recomandă ștergerea ulterioară cu prosopul deoarece se poate produce recontaminarea cu microorganismele prezente pe acesta. Momentul optim al recoltării îl reprezintă prima urină de dimineață sau după cel puțin 3 ore de la micțiunea anterioară. Pacientul urinează: aproximativ 10 ml pentru depistarea cantitativă a microorganismelor condiționat patogene si aproximativ 30-50 ml pentru depistarea microorganismelor patogene deosebite (bacil Koch). Se elimină primul jet de urină care are rolul de a spăla uretra de flora saprofită existentă la acest nivel după care, fără a întrerupe jetul de urină, se prinde într-un recipient steril volumul necesar de urină (jetul mijlociu). Proba recoltată se trimite imediat la laborator sau se păstrează la +4°C până în momentul prelucrării.

Figura 23. Urocultor

Transportul produselor patologice să se efectueze într-un timp cât mai scurt, iar dacă nu este posibil să se utilizeze medii de transport pentru a asigura viabilitatea microorganismelor. Dacă proba necesită prelucrare imediată, acest lucru trebuie menționat în buletinul de trimitere.

4.2. Examenul macroscopic

Reprezintă o etapă utilă pentru orientarea diagnosticului: Exemple:

• materii fecale de consistență redusă, apoase, cu mucus, striuri de sânge sau sangvinolernte, cu resturi alimentare insuficient digerate, paraziți vizibili cu ochiul liber,

• urina tulbure, cu sediment, cu sânge (hematurie),

• LCR opalescent, purulent, galben- verzui («în zeamă de varză») sau sangvinolent,

• lichid de puncție pleurală: opalescent, purulent, hemoragic,

• spută purulentă, hemoptoică (cu sânge),

• secreții, colecții purulente de culoare galben- verzuie, albăstrui (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniæ, Pseudomonas æruginosa*).

4.3. Examenul microscopic direct din produs patologic

Este o metodă pentru orientarea diagnosticului – aduce informații despre prezența bacteriilor, numărul, morfologia și structura bacteriilor, precum și despre caracterele lor tinctoriale (capacitatea bacteriilor de a fixa diferiți coloranți).

• frotiu direct din produs (exudat faringian, secreții otice, oculare, plăgi colecții purulente, spută, materii fecale) examinat la microscopul optic cu imersie cu 100X. Se efectuează 2- 3 frotiuri plus 1 de rezervă care se colorează:

- Colorația Gram: evidențiază prezența microorganismelor, morfologia (forma, mărime, dispoziție caracteristică), tinctorialitatea (Gram+/ violet sau Gram - / roz ciclam), relația cu PMN neutrofile (intr- / extraleucocitari),
- Colorație cu albastru de metilen (evidențiază citologia, leucocite PMN neutrofile, limfocite, levuri),
- Colorația Giemsa: permite vizualizarea cu acuratețe a morfologiei celulare, aprecierea cantitativă a predominanței PMN/ etiologie bacteriană sau limfocitară/ virală și *Mycobacterium tuberculosis*, prezența anomaliilor/ atipiilor celulare/ suspiciune de modificare neoplazică,
- Colorația Ziehl – Nielsen: suspiciune de infecție dată de *Mycobacterium tuberculosis* (direct din spută, colecție purulentă sau din sediment/ LCR, lichid pleural,

• preparat proaspăt între lamă și lamela (LCR, lichid pleural, alte lichide de puncție, urină, din sediment după centrifugare/ concentrare):

- în sedimentul urinar: prezența leucocitelor, hematiilor, celulelor epiteliale, cristale, floră bacteriană mobilă, levuri,
- preparat proaspăt din materii fecale (suspensie în ser fiziologic steril sau Lugol) se observă bacterii cu mobilitate caracteristică/ “spiralată”, “în tirbușon”: *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Vibrio cholerae* sau prezența elementelor parazitare/ ouă, chisturi etc.,
- sediment LCR: preparate proaspete cu colorație negativă/ tuș de China se observă prezența levurilor încapsulate: *Cryptococcus neoformans* (meningite levurice la bolnavii imunodeprimați/ SIDA),

- secreția vaginală suspensionată în ser fiziologic steril, cald, la 37ºC: se vizualizează prezența, morfologia și mobilitatea caracteristică pentru *Trichomonas vaginalis*,
- examen micologic direct: raclaj scuame cutanate, raclaj unghial în soluție KOH 20%,

Diagnostic bacteriologic pus exclusiv pe examen microscopic, fără etapele de izolare - identificare:

● asocierea fuso-spirilarate: angina ulcero-necrotică (flora bacteriană anaerobă) în angina Plaut- Vincent,

● vaginita parazitară cu *Trichomonas vaginalis*

● uretrita cu gonococ (necesită izolare, identificare și antibiogramă Avantajele examenului microscopic:

- rapid: 5- 20 min, ieftin,
- oferă suficiente date pentru orientarea diagnosticului,
- util în urgențe: meningite, infecții tract respirator inferior, tuberculoză, infecții urinare, boala diareică acută etc.
- permite diagnostic exclusiv pe examinarea microscopică.

4.4. Însămânțarea pe medii de cultură (cultivarea) pentru izolare

Însămânțarea produselor patologice se face în mod steril, cu ansa bacteriologică, tamponul de exudat sau pipeta Pasteur, folosind medii de cultură sterile și de compoziție adecvată (care să asigure condiții optime de dezvoltare microbiană, de creștere și multiplicare), pe suprafață sau în profunzime, cu scopul obținerii de culturi microbiene pure și colonii izolate.

Condiții de incubare:

○ temperaturi diferite: majoritatea bacteriilor de interes medical cresc bine la 37ºC, altele cresc optim la 42 ºC (*Campylobacter spp.*), altele cultivă și își exprimă caracterele pentru identificare la temperatura camerei 20-30ºC, iar fungi de interes medical cresc optim la 30 ºC,

○ atmosfera: bacteriile aerobe și facultativ anaerobe se cultivă în atmosferă normală (O_2 + 5% CO_2), bacteriile microaerofile se pot cultiva în termostate care pot fi reglate sau în pungi din plastic etanșe care au insuflate un amestec gazos (azot 85%, dioxid de carbon 8-10% și oxigen 5-7%), bacteriile strict anaerobe se cultivă pe medii agarizate în absența O_2

○ umiditatea este esențială pentru cultivarea unor bacteria mai ales dacă perioada de incubație se prelungește

○ timp de incubare: diferit în funcție de microorganismul responsabil de infecția respectivă (18- 24 ore, 48 ore, 5 zile, 7 zile, 60 zile),

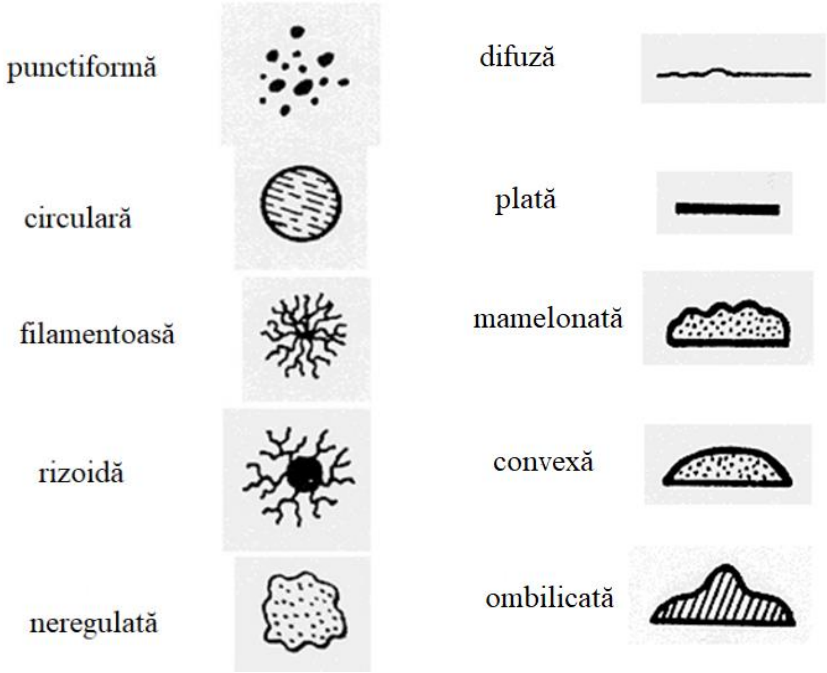
○ Obținerea de colonii izolate și cultură pură

ZIUA 2

4.5. Identificarea germenilor din cultură pură pe baza:

a. Caracterelor morfo-tinctoriale (frotiu Gram/ albastru de metilen/ Ziehl-Nielsen din colonie),

b. caractere culturale: dimensiunea coloniilor (exprimată în mm), forma, margini, suprafața colonii S/ smooth (cremoase), R/ rought (rugoase), M (mucoase, capsulate), hemoliza, pigment, invazie



c. teste biochimice: le studiem pe medii special de identificare și diferențiază pe baza proprietăților enzimatice (vizualizate pe un substrat colorat, prin modificarea de pH, virare de culoare) specii bacteriene, în cadrul genului, familiei

Figura 24. Teste biochimice API

d. teste antigenice: se utilizează anticorpi cunoscuți, pentru decelarea antigenelor necunoscute complementare. Exemple: reacția de aglutinare pe lamă, în tuburi, pentru identificarea Enterobacteriaceaelor (*E. coli, Salmonella, Shigella* etc), reacția latex aglutinare, coaglutinare,

e. teste de patogenitate: identificarea factorilor de patogenitate (ex. coagulaza liberă la *Staphylococcus aureus*), evidențierea efectelor patogenității bacteriene sau virale pe culturi celulare, prin metode *in vitro* sau infecția experimentală la animalul de laborator, metode *in vivo*, cum ar fi testul de patogenitate al *Shigellei disenteriae* pe mucoasa conjunctivală de cobai (Test Sereny). Se mai poate determina pe baza sensibilității la acțiunea fagilor specifici (lizotipie) PCR.

4.6. Metode moleculare (extracție de acizi nucleici, amplificare, detecție)

Pe baza caracterelor genetice (gene cromozomale sau plasmidice specifice, utile în identificare, rezistența la antibiotice) evidențiate prin metode/tehnici de biologie moleculară.

Figura 25. Real Time PCR

Figura 26. Extractor PCR

4.7. Testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase (antibiograma)

Urmărește determinarea sensibilității/ rezistenței la antibiotice (metode cantitative care urmăresc determinarea CMI (concentrația minimă inhibitorie) și CMB (concentrație minimă bactericidă).

ZIUA 3

● Identificarea finală a agentului etiologic cu încadrarea în familie, gen, specie, subspecie, serotip.

● Citirea și interpretarea antibiogramei cu încadrarea în fenotipuri de rezistență

● Introducerea rezultatului final al identificării și testării sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase în sistemul informatic, stocarea date- lor și comunicarea acestora clinicienilor.

2. Diagnostic serologic

1. Evidențierea răspunsului imun umoral prin producerea de Ac (Ig-imunoglobuline) după întâlnirea cu un antigen specific (infecții bacteriene) prin reacțiile antigen-anticorp (reacția de aglutinare, reacția de precipitare, imunoflurescență)

2. Evidențierea răspunsului imun celular (proliferare a liniei limfocitare LT), după un contact al organismului cu un antigen viral sau *M.tuberculosis* (IDR la tuberculină)

Examenul microscopic

Examenul microscopic are un rol fundamental în microbiologie, fiind o etapă importantă în examinarea produselor biologice. Examenul microscopic direct restrânge aria de investigații, indicând modalitățile ulterioare de diagnostic microbiologic. El se poate efectua la:

- ***microscopul cu câmp luminos*** - la care se examinează preparatele colorate sau preparate native,
- ***microscopul cu fond întunecat*** - la care se examinează preparatele native, între lamă și lamelă, efectuate direct dintr-un produs în care se caută bacterii a căror lățime nu depășește 0,1-0,2 μm (ca, de exemplu, evidențierea treponemelor din șancrul sifilitic),
- ***microscopul cu contrast de fază*** - se folosește la examinarea preparatelor native în care microorganismele și celulele au aspect tridimensional,
- ***microscopul cu lumină UV*** se utilizează pentru examinarea preparatelor colorate cu substanțe fluorescente.

Prin microscopie se examinează:

• preparate native între lamă,

• frotiuri fixate, colorate,

• preparate colorate cu substanțe fluorescente la microscopul cu lumină UV.

Frecvent utilizate în laborator sunt colorația simplă cu albastru de metilen și colorațiile diferențiale Gram și Ziehl-Nielsen.

A) Colorația Gram reprezintă colorația de bază în microbiologie și a fost descrisă în 1884 de medicul danez Christian Gram. Această colorație împarte bacteriile în două grupe: bacterii Gram pozitive, colorate în violet și bacterii Gram negative, colorate în roșu. Diferența de culoare se datorează deosebirilor de structură, respectiv de permeabilitate ale peretelui celular.

Tehnica colorației:

• frotiul fixat la flacără se acoperă cu soluție de cristal violet timp de 1 minut,

• se spală lama cu lugol și se acoperă cu lugol 2 minute (iodul servește ca mordant în colorație);

• se îndepărtează lugolul și se decolorează câteva secunde cu alcool-acetonă sau 2 minute cu alcool absolut;

• se spală cu apă;

• se acoperă lama cu soluție de fuxină fenicată diluată 1/10, 1 minut, se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Colorația Gram evidențiază prezența microorganismelor, morfologia (formă, mărime, dispoziție caracteristică), tinctorialitatea (Gram pozitive /Gram negative), frecvența PMN, relația cu PMN neutrofile (intra- / extraleucocitari)

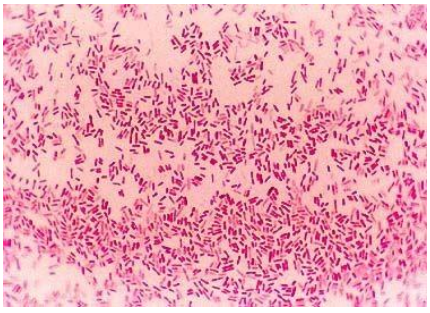
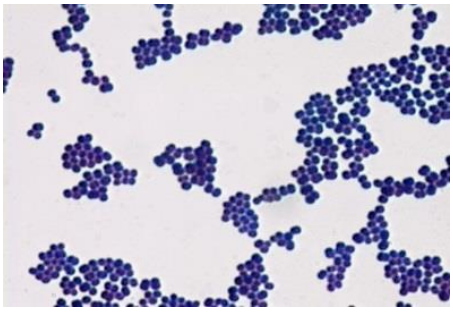
a)  b) 

Figura 27. Colorația Gram: a) bacilli gram negative și b) coci gram pozitivi

B) Colorația Ziehl-Nielsen. Acido-alcoolo-rezistența este proprietatea unor bacterii din genul *Mycobacterium* (bacilul tuberculos și al leprei) și *Nocardia*. Aceste bacterii se colorează la cald din cauza structurii peretelui celular care are în stratul superficial o ceară. Odată colorate, ele nu mai pot fi decolorate nici cu alcool și nici cu acizi. Acest tip de colorație se poate efectua direct din spută, colecție purulentă sau din sediment LCR, lichid pleural.

Tehnica:

• se fixează frotiul la flacără;

• se acoperă frotiul cu soluție de fuxină fenicată Ziehl, se încălzește până la apariția vaporilor, repetându-se această încălzire de 3 ori în decurs de 10 minute (pentru încălzire se utilizează o tijă metalică care are montat un tampon de vată la unul din capete; tamponul se umectează cu alcool și se aprinde);

• se decolorează cu acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric 1/5 până dispare culoarea roșie;

• se spală cu apă;

• se recolorează cu soluție de albastru de metilen 1-2 minute;

• se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop.

Bacilii acido-alcoolo-rezistenți (BAAR) (baciul Koch și bacilul leprei) sunt colorați în roșu pe fondul albastru al preparatului. Restul microbilor prezenți se colorează, de asemenea, în albastru. Acești bacili nu pierd colorantul la decolorarea cu alcool și acid datorită prezenței acidului micolic și a proprietăților de permeabilitate selectivă a membranei celulare.

BAAR se mai pot colora si cu substanțe fluorescente cum este auramina sau un amestec de auramină-rhodamină, cu decolorare consecutivă cu un amestec de alcool și acid. BAAR rețin colorantul, ceea ce permite evidențierea lor la microscopul cu fluorescență.

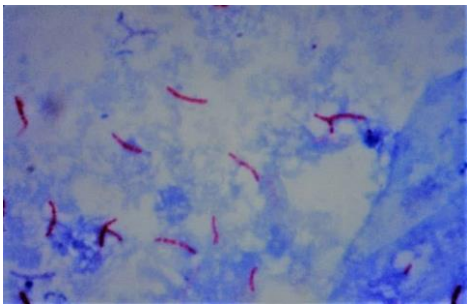


Figura 28. Frotiu colorație Ziehl - Nielsen

Exemple de bacterii Gram pozitive/negative

TINCTORIA-LITATEA	**FORMA BAC-TERIILOR**	**FAMILIA/ GRUPUL**		**GENUL**	**AȘEZARE**
GRAM POZITIVI	COCI	*Micrococaceae*		*Staphylococcus*	grămezi
		Streptococaceae		*Streptococcus* *Enterococcus*	*diplo/lanțuri*
	BACILI	Sporulați	Aerobi	*Bacillus*	*lanțuri/diplo*
			Anaerobi	*Clostridium*	*sporul dispus central sau terminal*
		Nesporulati		*Corynebacterium*	litere chinezesti/
				Listeria	cocobacili
GRAM NEGATIVI	COCI	*Neisseriaceae*		*Neisseria*	In diplo cu concavitățile față în față
	BACILI	*Enterobacteriaceae*		*Escherichia*	neregulată
				Salmonella	
				Shigella	
				Klebsiella	
				Enterobacter	
				Proteus	
				Morganella	
				Yersinia	
		Non-fermentativi		*Pseudomonas*	
				Acinetobacter	
		Vibrionaceae		*Vibrio*	virgulă
		Spirillaceae		*Campylobacter* *Helicobacter*	spiralați încurbați
		Diverse		*Haemophilus*	cocobacili
				Brucella	
				Bordetella	

5. Testarea sensibilității la antibiotice a germenilor izolați în infecții

Chimioterapicele antiinfecțioase sunt definite ca un grup de medicamente, cu toxicitate selectivă, capabile să distrugă și să stânjenească multiplicarea unor organisme patogene, implicate etiologic în variate infecții.

Principii de bază ale chimioterapiei antiinfecțioase:

- toxicitatea selectivă prin exploatarea diferențelor de structură și metabolism a agenților patogeni și a celulei gazdă (a omorî microorganismul și nu gazda umană)
- atingerea unei concentrații inhibitorii la sediul infecției
- penetrarea și atașarea de țintă, evitând inactivarea și eliminarea

Metode de testare a sensibilității *in vitro*
Cele mai utilizate tehnici sunt:

- **tehnicile calitative:**
- antibiograma difuzimetrică (cu discuri)
- **tehnicile cantitative:**
- metoda diluțiilor în mediu lichid
- metoda diluțiilor în agar
- metoda microdiluțiilor în agar
- testul E
- **metode și sisteme comerciale, automatizate, de testare**

5.1. Antibiograma difuzimetrică Kirby- Bauer

Este metoda uzuală pentru laboratoarele care testează un număr relativ mic de tulpini bacteriene cu creștere rapidă și fără diferențe semnificative de la tulpină la tulpină a ratei de creștere.

Din punct de vedere tehnic însămânțăm germenul de testat pe mediul solid (agar Mueller-Hinton turnat în plăci Petri în strat uniform de 4 mm grosime). Mărimea inoculului în ser fiziologic steril este standardizată la 0,5 Mac Farland (corespunzător unei densități de 10_8 germeni/ml). Însămânțarea se poate realiza prin inundarea plăcii urmată de aspirarea, aseptic, a excesului de inocul sau cu ajutorul unui tampon. După aproximativ 5 minute (timp în care placa Petri se lasă cu capacul întredeschis în vecinătatea becului de gaz aprins, se aplică microcomprimatele în care sunt încorporate antibiotice în concentrație standardizată. Substanțele antimicrobiene se prezintă sub forma unor microcomprimate (discuri), având inscripționate pe ambele fețe simbolul antibioticului și concentrația. Aplicarea microcomprimatelor se poate face cu ajutorul unei pense, în condiții aseptic sau cu ajutorul unui aplicator automat, la minim 15 mm distanță între ele și 30 mm de marginea plăcii.

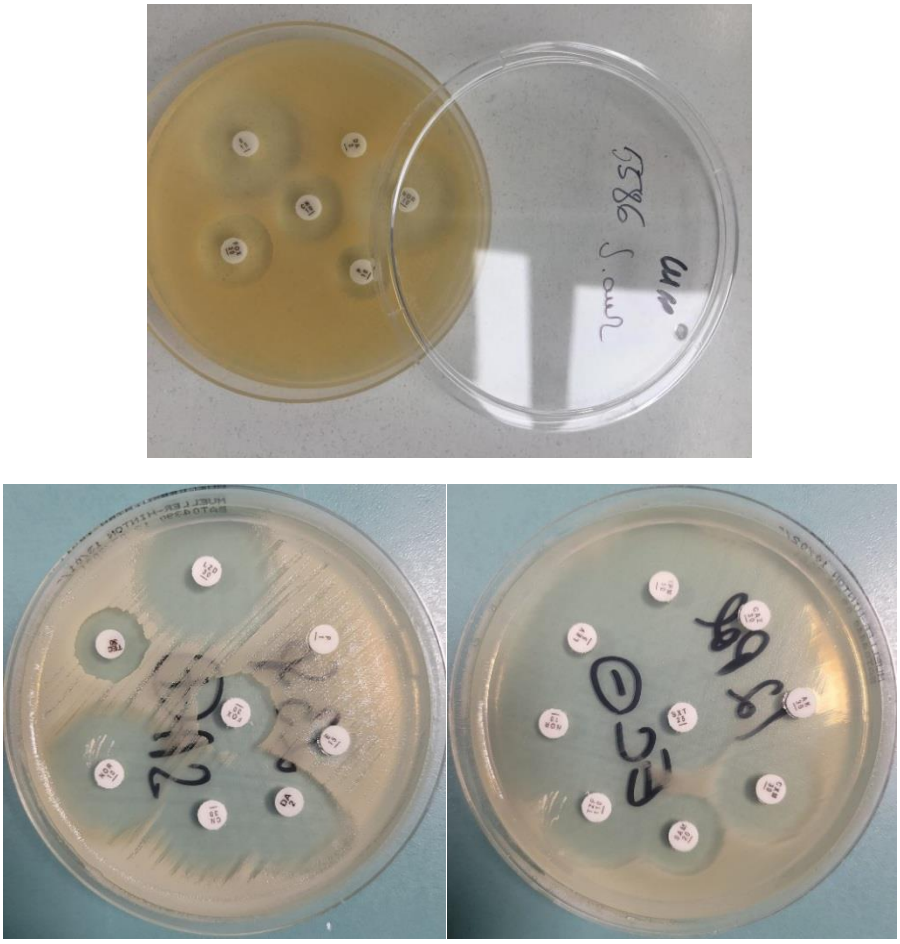


Figura 29. Antibiograme difuzimetrice

Microcomprimatele trebuie să vină în contact perfect cu mediul, motiv pentru care, cu ajutorul unei pense le presăm ușor. După incubăm plăcile peste noapte în termostat (16-18 ore), la 37ºC sau în funcție de temperatura optimă de multiplicare a microorganismului testat. Antibioticul eliberat din microcomprimat difuzează în mediu, realizând zone de inhibiție în care coloniile microbiene nu se dezvoltă. Cu cât zona de inhibiție este mai largă, cu atât germenul va fi considerat mai sensibil. Dacă în interiorul zonei de inhibiție (chiar dacă diametrul înregistrat este foarte mare) se dezvoltă colonii (mutanți rezistenți), germenul va fi considerat rezistent.

Se măsoară cu rigla și se exprimă în mm zona de inhibiție completă. Corelația dintre diametrele zonelor de inhibiție și sensibilitatea bacteriei se face prin consultarea tabelelor corespunzătoare din standardele CLSI sau EUCAST. Rezultatele se exprimă în sensibil, rezistent și intermediar sensibil.

De menționat că trusa de microcomprimate diferă la bacteriile gram pozitive de cele gram negative și nonfermetativi. Alegerea antibioticelor testate ține cont de: rezistența naturală, localizarea infecției, riscul de multirezistență.

5.2. Metoda diluțiilor în mediu lichid

Metoda diluțiilor permite stabilirea CMI și CMB.

- concentrația minimă inhibitorie (CMI), reprezentată de cantitatea minimă de antibiotic care inhibă complet multiplicarea bacteriilor;
- concentrația minimă bactericidă (CMB), reprezentată de cantitatea minimă de antibiotic capabilă să distrugă ≥ 99,99% din bacterii.

Deși costul acestei metode este ridicat, ea este indicată în situații de urgență .

Principiu: se realizează diluții crescânde de antibiotic în mediu lichid, care se pun în contact cu cantități fixe din cultura bacteriană, se incubează 18-24 de ore la 37°C și se stabilește concentrația cea mai mică de antibiotic care nu per- mite creșterea bacteriană. Aceasta va fi CMI.

Determinarea CMB

Principiu: după citirea CMI-ului, se transferă o cantitate fixă, din eprubetele în care microorganismul nu a crescut, pe un mediu de cultură solid. Se incubează 18-24 de ore la 37°C, după care se notează cea mai mică concentrație la care bacteriile nu au mai crescut. Aceasta va reprezenta CMB.

5.3. Metoda diluțiilor în agar

Este tehnica pentru testări precise și reproductibile.

Principiu. Încorporarea unui agent antimicrobian în mediu cu agar solid sau semisolid, în progresie geometrică a concentrațiilor și aplicarea unui inocul bacterian definit pe suprafața mediului cu agar.

5.4. Metoda microdiluțiilor pe sistemul Vitek (BioMerieux, France)

Card Vitek 2 Compact

Figura 30. VITEK® 2 COMPACT - sistem automatizat de identificare și testare a sensibilității bacteriene

Figura 31. Card Vitek

5.5. Testul E

Îmbină simplitatea antibiogramei difuzimetrice cu precizia testării cantitative făcând economie de timp.

Pe suprafața unei plăci Petri cu mediu de cultură solid (Muller- Hinton) inoculată cu tulpina de testat se aplică langhetele cu antibiotic ce se dispun radiar. Aceste langhete sunt din plastic și au fixate 15 diluții de antibiotic, la un capăt concentrația este minimă, iar la celălalt este maximă. Interpretarea zonei de inhibiție permite aflarea CMI.

CLSI sau EUCAST recomandă ca singură metodă pentru testarea sensibilității la Ceftriaxon a pneumococilor sau testarea sensibilității la antibiotice pentru germenii anaerobi testul E.

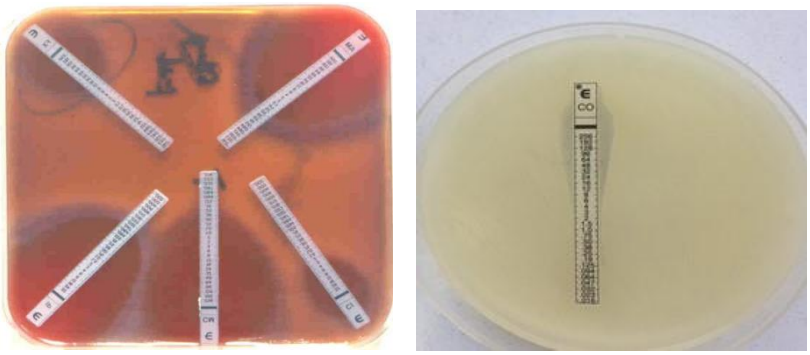


Figura 32. Test E.

6. Reacții imunologice în diagnosticul de laborator al infecțiilor

Reacția Ag-Ac este determinată de interacțiunea specifică dintre epitopii antigenului (Ag) și paratopii anticorpilor (Ac). Legătura Ag-Ac este specifică și reversibilă.

Afinitatea unui Ac pentru un Ag specific depinde de complementaritatea sterică dintre paratop și epitop. Un paratop se poate combina cu un singur epitop, numit "specific". Astfel, dacă este cunoscut unul din elementele reacției - Ag sau Ac, poate fi identificat celălalt.

6.1. Reacția de aglutinare bacteriană

Aglutinarea bacteriană este o reacție antigen-anticorp, în care antigenul este reprezentat de celule bacteriene sau fragmente de celule bacteriene în suspensie. Sub acțiunea anticorpilor specifici, complexele imune antigen-anticorp formează rețele tridimensionale, constituind agregate vizibile. Reacția de aglutinare se folosește atât în identificarea unor bacterii pe baza proprietăților antigenice, cât și pentru evidențierea anticorpilor aglutinanți din serul de bolnav.

6.1.1. Aglutinarea pe lamă se folosește preponderent în diagnosticul bacteriologic, pentru identificarea rapidă pe baza proprietăților antigenice a unor tulpini izolate din produsul patologic și mai puțin în diagnosticul serologic.

Principiu: Se amestecă o picătură de ser imun și o picătură de suspensie bacteriană (Ag)din cultură de 18-24 de ore, pe o lamă curată, degresată. Lectura se face la microscop sau cu ochiul liber. In caz de reacție pozitivă apar conglomerate sub forma unor grunji albi, fini, iar lichidul se clarifică; în caz de reacție negativă, lichidul rămâne tulbure.

Aglutinarea se folosește și în diagnosticul serologic. Dacă o astfel de reacție este pozitivă se continuă cu reacția de aglutinare cantitativă, în tuburi.

6.1.2. Aglutinarea în tuburi se folosește pentru diagnosticul serologic. Se folosesc 6 eprubete în care se realizează diluții succesive crescătoare din serul de cercetat în ser fiziologic și apoi se adaugă aceeași cantitate de antigen standard. Titrul reacției este reprezentat de cea mai mare diluție de ser la care se mai observă aglutinarea.

Exemple: Reacția Vidal pentru febra tifoidă și febrile paratifoide, reacția Weil-Felix pentru tifosul exantematic

6.1.3. Aglutinarea pasivă sau aglutinarea pe suport este utilizată când antigenul este o soluție moleculară. După ce este fixat antigenul devine aglutinabil în prezența unui ser imun. Reacțiile se pot folosi atât pentru identificarea unui antigen cât și pentru detectarea anticorpilor corespunzători folosind un antigen cunoscut. In

calitate de suport inert pot servi hematiile, particule de latex, cristale de colesterol. Suspensia de particule sensibilizate cu Ag sau Ac este pusă în contact cu serul imun (respectiv cu Ag), ca și în cazul aglutinării directe. Avantajele reacțiilor indirecte: facilitatea lecturării și sensibilitatea înaltă

6.2. Reacțiile de precipitare

Imunoprecipitarea se manifestă doar atunci când Ag solubil este amestecat cu Ac corespunzător. Ea poate fi observată în mediu lichid, sau solid, fiind sau calitativă, sau cantitativă. Acestea sunt reacții specifice dar puțin sensibile, ce necesită cantități importante de anticorpi. Precipitarea complexelor molecula- re rezultate din uniunea Ag-Ac este determinată de formarea unei rețele tridimensionale de Ag reunite prin Ac. Precipitarea maximă corespunde cu zona de echivalență, unde Ac și Ag sunt în raport optimal de concentrație, ce permite precipitarea tuturor moleculelor de Ac cu Ag corespunzător. In exces de Ag sau de Ac precipitatul nu se formează.

Utilizare: în medicina legală (determinarea apartenenței de specie a diferitelor proteine: sânge, spermă), în igiena alimentară (depistarea falsificării alimentelor), în diagnosticul bolilor infecțioase.

6.2.1. Precipitarea în mediu lichid

A. Reacția de precipitare inelară

Într-un tub se introduce serul imun apo cu o pipetă se prelinge încet soluția de Ag ca să nu se amestece cu serul. Daca Ac din ser corespund cu Ag, în zona de separare a celor doua lichide se formează un inel alb, ceea ce semnifică precipitarea complexului Ag-Ac. Avantajul metodei – rapiditatea si simplitatea metodei. Exemple: reacția Ascoli pentru depistarea antigenului polizaharidic al antraxului.

B. Reacția de floculare

Se efectuează diluții succesive din serul imun (Ac) la care se adaugă cantități egale de Ag. Se introduc probele în termostat și periodic se examinează pentru depistarea tubului în care apare precipitatul inițial (zona de echivalență). Exemple: pentru determinarea cantității de toxină, antitoxină sau anatoxină.

6.2.2 Precipitarea în mediu solid (în gel)

În aceste reacții Ag și Ac difuzează unul spre altul prin geloză și în zona de echivalență a acestor doi parteneri de reacție se produce precipitarea sub forma de linii. Dacă există mai multe sisteme Ag-Ac, se vor forma linii de precipitare distincte. Exemple: utilizată în analiza calitativă a unui amestec de Ag într-o soluție.

A. Imunodifuzia simplă radială (tehnica Mancini)

Se efectuează pe o placă cu geloză, în care sunt încorporați Ac specifici. Ag este depus în godeurile din stratul de geloză. Ag difuzează radial în geloză pe parcursul a 48 ore. Daca Ag corespunde Ac, atunci are loc formarea de discuri de precipitare, cu suprafața proporțională concentrației de Ag din godeu. Exemple: identificarea și cuantificarea Ig, hormonilor, enzimelor.

B. Imunodifuzie dublă (tehnicile Ouchterlony si Elek)

Se toarnă geloză în placa Petri. In tehnica Ouchterlony Ag si Ac difuzează din godeurile situate la o distanță de 15 mm unul de altul. In tehnica Elek cei 2 reactivi difuzează din benzile de hârtie plasate pe suprafața gelozei. Moleculele difuzează în gel în funcție de greutatea lor și formează linii de precipitare pentru fiecare sistem Ag-Ac ce corespund în zona lor de echivalență. Dacă doua Ag sunt identice, liniile lor se unesc, dacă sunt diferite – se intersectează. Exemple: determinarea toxinelor (toxigeneză), antitoxinelor, Ag proteice.

C. Contraimunoelectroforeza (CIEF)

Este utilă la examinarea amestecurilor antigenice complexe. Citirea este posibilă peste 90 minute. Geloza este turnată pe o placă de sticlă, Ag și Ac sunt dispuși în rezervoare circulare de 2 mm diametru, la o distanță de 10 mm. In timpul electroforezei Ag, încărcat negativ, migrează spre polul pozitiv, întâlnind Ac care migrează spre catod. La interacțiunea Ag și Ac omologi are loc formarea liniei de precipitare. Exemple: examinarea componentelor Ag din lichide biologice: LCR, urină, lichid pleural, ascită.

6.3. Reacții cu participarea complementului

Activarea fracțiilor complementului (C) duce la liza particulei purtătoare de Ag (hematii, bacterii, diverse celule). Activarea complementului se poate realiza pe cale clasică, alternativă sau lectinică.

Reacția de fixare a complementului (RFC)

Este o reacție complexă, constituită din 2 sisteme Ag-Ac și cu participarea complementului (C). În RFC participă Ig capabile să fixeze C – IgM și IgG. Exemple: în diagnosticul virozelor, infecțiilor bacteriene.

Reacția se efectuează în 2 etape utilizând 2 sisteme.

Prima etapă – Ag1 (Ag cunoscut sau Ag necunoscut), Ac1 (serul bolnavului sau serul imun) și complement. Dacă Ac se combină cu Ag omolog va avea loc și fixarea C (efect frecvent invizibil).

A doua etapă – la sistemul de bază se adaugă sistemul indicator (hemolitic), constituit din hematii de berbec (Ag2) combinate cu Ac specifici – serul hemolitic (Ac2).Evaluarea rezultatelor – dacă complementul a fost fixat de primul sistem Ag-Ac hemoliza nu se observă (rezultat pozitiv). Dacă Ag1 nu corespunde cu Ac1, complementul rămâne disponibil pentru fixare pe sistemul indicator Ag2- Ac2, provocând hemoliziță (rezultat negativ).

6.4. Reacţii cu utilizarea Ac marcaţi

6.4.1. Reacţia de imunofluorescenţă (RIF)

A) Metoda directă utilizată în scop de seroidentificare. Din materialul ce conţine Ag (cultura pură, biopsie tisulară) se prepară un frotiu, peste care se aplică serul imun specific cu Ac marcaţi cu fluorocrom. Peste 20 min de incubare este citit la microscopul pentru imunofluorescenţă. În caz de reacţie pozitivă se observă luminiscenţa locală.

B) Metoda indirectă. Poate fi utilizată pentru seroidentificare şi sero-diagnostic. Pe frotiul ce conţine Ag se aplică Ac corespunzători nemarcaţi. Se spală preparatul, apoi se adaugă anti-Ig fluorescentă, care se va combina cu Ac din complex.

6.4.2. Reacţia imunoenzimatică

A) Tehnica imunoblot (western blot) permite identificarea Ag sau a Ac dintr-un amestec. I etapă – electroforeza în gel a probei de Ag, II etapă – transferul electric al Ag pe membrana de nitroceluloza, III etapă – pe membrană sunt aplicaţi succesiv Ac dirijaţi contra Ag, apoi conjugatul marcat cu enzimă, care permite depistarea Ac fixaţi. După o spălare se adaugă substratul cromogen. Fiecare complex Ag-Ac formează zone colorate distinct. Exemple: depistarea Ac anti-HIV, caracterizarea Ac monoclonali.

B) Tehnica ELISA

Proteinele sunt separate electroforetic în gel poliacrilamid. Sub acţiunea câmpului electric are loc difuzia proteinelor conform greutăţii moleculare, aranjându-se în zone liniare subţiri diferite: mai aproape de start se aranjează proteinele cu masă moleculară mare (120-150 kDa), la final se aranjează proteinele cu masă moleculară mică (5-10kDa). Apoi lamela de gel este transferată pe o foaie de nitroceluloză amplasată între electrozii unei surse de curent continuu. Sub acţiunea câmpului electric are loc trecerea proteinelor din gel pe nitroceluloză, unde se fixează foarte bine pe hârtie. Proteinele fixate sunt marcate cu o enzimă incoloră. Procedura ulterioara de montare a reacţiei este similara.

C) Analiza radioimună (RIA)

Ag se fixează la fundul godeurilor din placa de plastic. Se adaugă Ac testaţi care se vor combina cu Ag omolog. După spălarea godeurilor, se adaugă un ligand radiomarcat (anti-Ig). După eliminarea excesului de izotopi prin spălare, se măsoară radioactivitatea: ea este proporţională cu concentraţia Ac dozaţi.

Bibliografie

1. Elena Hogea, Livia Stânga, Microbiologie, virusologie: îndreptar de lucrări practice pentru studenții Facultății de Medicină Dentară 2021, ISBN 978-606-32-0964-2
2. Anca Ungureanu, Parazitologie medicala, Editura Sitech, Craiova, 2004, ISBN 973-657-725-2
3. Buiuc D., Neguț M. și colab. Tratat de microbiologie clinică, ediția a II-a, ISBN 13-973-39-0593-3, Ed. Medicală București, 2009.
4. Cedric A. Mims, Medical Microbiology, 2012, Publisher: Mosby Inc, ISBN-10: 0323035752, ISBN-13: 9780323035750.
5. Cristian Hodarnau, Laura Simon, Cecilia Bobos, Petrica Ciobanca, Microbiologie- Lucrări practice pentru uzul studenților Facultății de Medicină Dentară, Editura Risoprint, Cluj-Napoca, ISBN 978-973-53-0429-4
6. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin, Principles and practice of infectious diseases, vol 2, Seventh edition, Churchill livingstone Elsevier, 2010, ISBN 978-0-430-6839-3
7. Lakshman Samaranayake, Essential Microbiolog y for Dentristry, 4 th edition, 2011, Churchill Livingstone Elsevier, ISBN-13:978-0-702034848
8. Lia Monica Junie, Microbiologie Clinică, Bacteriologie și Virusologie medicală, Cluj-Napoca, 2017, ISBN 978-973-693-769-9
9. Licker Monica si colab, Microbiologie Generale-Îndreptar de lucrări practice, carte electronică, ISBN 13 978-606-8456-43-0
10. Licker Monica, Moldovan Roxana, Curs de Microbiologie specială Vol. I, Bacteriologie, Lito UMF, Timișoara 2013
11. Moldovan Roxana și colab., Lucrări practice de Microbiologie, Editura Victor Babeș Timișoara 2013, ISBN 978-606-6456-19-5
12. Moldovan Roxana și colab., Lucrări practice de Microbiologie, Editura Victor Babeș Timișoara 2013, ISBN 978-606-6456-19-5
13. N. Cary Engleberg, Moselio Schaechter, Victor J. DiRita, Victor J. DiRita, Terence S. Dermody, Terence S. Dermody,Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease, 2013, 5th Edition, Publisher: Lippincott Williams & Wilkins, ISBN- 978-0-7817-8744-4
14. Patrick R. Murray, Ph.D., Ken S. Rosenthal, Ken Rosenthal, Review of Medical Microbiolog y, , 8 Edition, 2015, Publisher: Mosby Inc., ISBN-13: 978-0323299565, ISBN-10: 0323299563
15. Patrick R. Murray, Ph.D., Ken S. Rosenthal, Ph.D., Michael A Pfaller, Medical Microbiolog y: with student consult online access., MD, 8th edition, 2015., ISBN-10: 0323299563, ISBN-13: 9780323299565.
16. Philip D. Marsh, Michael V. Martin, Oral Microbilog y, fifth edition, 2009, Churchill Livingstone Elsevier, ISBN:0443101442.
17. Roxana Moldovan, Monica Licker, Curs de Microbiologie specială Vol. II, Micologie și Virusologie, Lito UMF, Timișoara 2013

18. Roxana Moldovan, Monica Licker, Elena Hogea, Luminița Bădiţoiu, Microbiologie generală, LITO-UMFT, Timișoara 2015
19. Simona Rădulescu, Parazitologie medicala, Editura All, 2000, ISBN 973-684-214-2
20. Xuedong Zhou, Yuqing Li, Atlas of oral microbiolog y from healthy microflora to disease, Elsevier, ISBN:978-0-12-802234-4