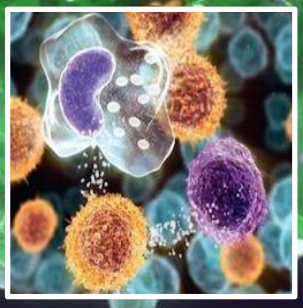
UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

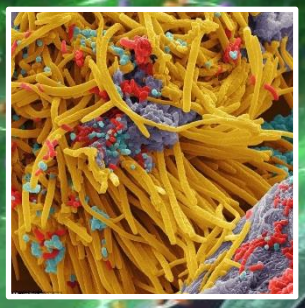
ELENA HOGEA LIVIA STÂNGĂ

MICROBIOLOGIE SPECIALĂ

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 978-606-786-238-6

Cuprins

1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci Gram pozitivi ai cavității orale 5
1.1. Genul *Staphylococcus* 5
1.2. Genul *Streptococcus* 10

2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci gram negativi și bacili gram pozitivi aerobi ai cavității orale 15
2.1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci gram negativi 15
2.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili gram pozitivi aerobi 18

3. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de enterobacterii 25
3.1. Genul *Escherichia* 30
3.2. Genul *Klebsiella* 33
3.3. Genul *Proteus* 35

4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili Gram negativi non fermentativi și bacteriile anaerobe 39
4.1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili Gram negativi non fermentativi 39
4.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili Gram pozitivi anaerobi sporulați și alte bacterii anaerobe 41

5. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Treponema, Mycobacterium* 50
5.1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Treponema* 50
5.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Mycobacterium* 56

6. Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice 61

7. Diagnosticul de laborator al infecțiilor virale 66

8. Diagnosticul de laborator în hepatite și SIDA 68
8.1. Hepatita B 68
8.2. Hepatita C 73

8.3. Hepatita D..... 73
8.4. Hepatita A..... 74
8.5. Hepatita E..... 75
8.6. Infecția HIV..... 75

9. Diagnosticul de laborator al infecțiilor parazitare..... 78

Bibliografie 83

1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci Gram pozitivi ai cavității orale

1.1. Genul *Staphylococcus*

Genul Staphylococcus aparține *familiei Staphylococcaceæ.*

Stafilococii sunt coci Gram pozitivi, așezați în ciorchine, imobili și nesporulați. Genul *Staphylococcus* are 38 de specii, dintre care 18 specii se izolează de la om.

Stafilococii sunt agenți etiologici în peste 80% din infecțiile supurative întâlnite în practica medicală. Manifestă afinitate pentru țesutul dermic și pentru anexele pielii, fapt care explică de ce stafilococii provoacă mai ales infecții la nivelul tegumentelor și anexelor pielii, însă ei pot invada practic orice țesut sau organ.

Principalele specii ale genului sunt: *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* și *S. saprophyticus.*

*Staphylococcus aureu*s sunt coci coagulazo-pozitivi, frecvent hemolitici, care determină majoritatea infecțiilor stafilococice umane.

Localizările și manifestările infecției stafilococice:

1. Tegumente și țesut celular subcutanat: foliculite, furuncule, hidrosadenite, abcese, flegmoane.
2. Țesut osos și articular: osteomielite și artrite.
3. Rinofaringe și cavități adiacente: faringite, angine, sinuzite, otite supurate, mastoidite.
4. Tub digestiv: toxiinfecții alimentare.
5. Aparat genital: mastite, metrite, anexite, septicemii postabortum.
6. Aparat urinar: prostatite, cistite, pielonefrite, abcese renale.
7. Aparat cardiovascular: flebite, pericardite, endocardite.
8. Sistem nervos central: meningită și abcese cerebrale.
9. Fanere: panariții și abcese.
10. Sindromul de șoc toxicoseptic (TSST), cauzat de o toxină stafilococică particular numită Toxic Shock Syndrome Toxin.

Infecția nosocomială care este condiționată de existența purtătorului de stafilococ coagulazo-pozitiv (la nivelul rinofaringelui) într-o colectivitate (spital).

Infecțiile cu *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent, cu rezistență multiplă la antibiotice (betalactamine, macrolide, aminoglicozide, cotrimoxazol), sunt greu de controlat în condițiile evoluției în mediul spitalicesc.

Unii stafilococi coagulazo-negativi se încadrează în categoria oportuniștilor. Acest aspect s-a conturat în relație directă cu utilizarea pe scară largă a procedurilor medicale invazive (sonde, catetere) și a inserțiilor protetice (șunturi, valve cardiace, proteze vasculare și articulare). *Staphylococcus epidermidis* se constituie în cauză majoră de infecții nosocomiale în secțiile de nou-născuți și oncologie, dar și în serviciile cardiologice (infecții de pacemaker, endocardita asociată cu valve protetice). *Staphylococcus saprophyticus* constituie un agent etiologic implicat în infecții urinare la femei tinere, iar la bărbați în uretrite nespecifice și prostatite.

<u>Diagnosticul de laborator</u> folosește metodele diagnosticului bacteriologic. **Recoltarea** probelor patologice se face în funcție de localizarea infecției. **Examenul direct** din produsul patologic are valoare orientativă în anumite situații și poate evidenția în colorația Gram, coci Gram pozitivi, așezați mai frecvent izolat și mai rar sub aspectul caracteristic în ciorchine (este utilă din puroi, urină, LCR, sânge).

Izolarea: se efectuează pe geloză-sânge iar în cazul probelor patologice polimicrobiene sau pentru alimente se utilizează mediul Chapman (mediu hiperclorurat cu manitol).

Identificarea :

● proprietăți morfotinctoriale: în frotiul colorat Gram se pun în evidență coci Gram pozitivi așezați în ciorchine.

● proprietăți de cultură: pe mediul Chapman, *S. aureus* degradează manitolul și provoacă virarea culorii mediului din roz-roșu în galben; pe geloză sânge *S. aureus* se dezvoltă sub formă de colonii S înconjurate de un halou de liză; pe geloză sânge se pot observa colonii de tip S, frecvent pigmentate în galben-auriu.

● proprietăți biochimice: stafilococii produc catalază; degradează glucoza pe cale oxidativă și fermentativă; *Staphylococcus aureus* degradează manitolul pe mediul Chapman, în timp ce *S. epidermidis* nu utilizează substratul amintit.

● proprietățile de patogenitate ale *S. aureus* se bazează pe capacita- tea acestora de a elibera enzime și toxine, a căror activitate poate fi evidențiată prin teste de patogenitate "*in vivo*" sau "*in vitro*".

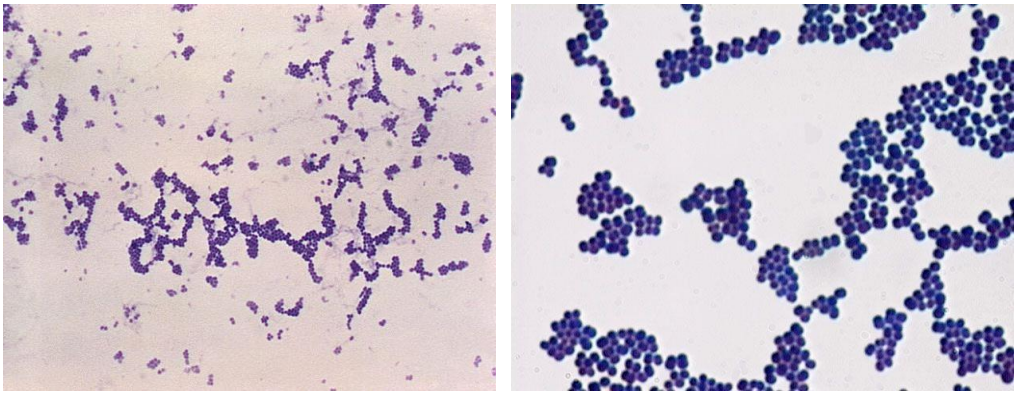


Figura 1. Staphylococcus sp.: Examen microscopic din cultură-colorație Gram

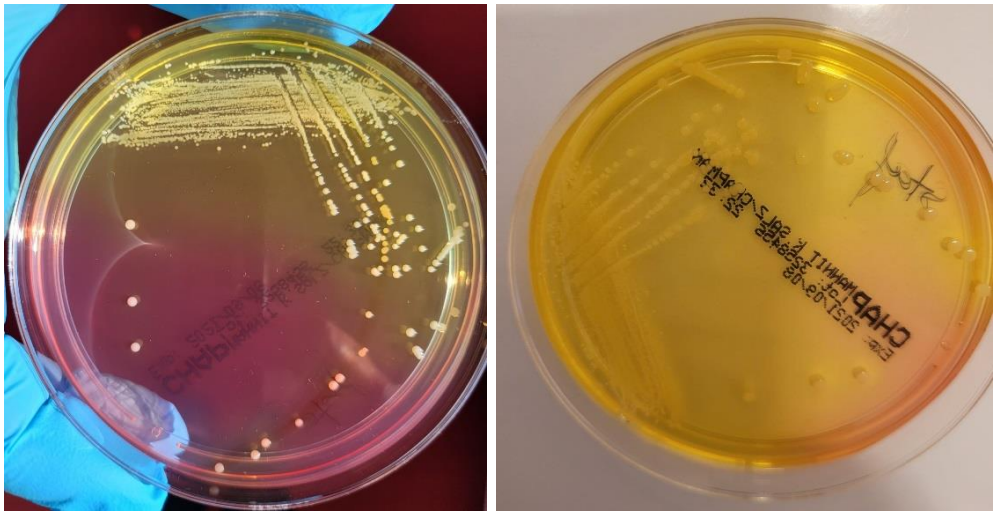


Figura 2. Colonii de *Staphylococcus aureus* – Mediu de cultură Chapman

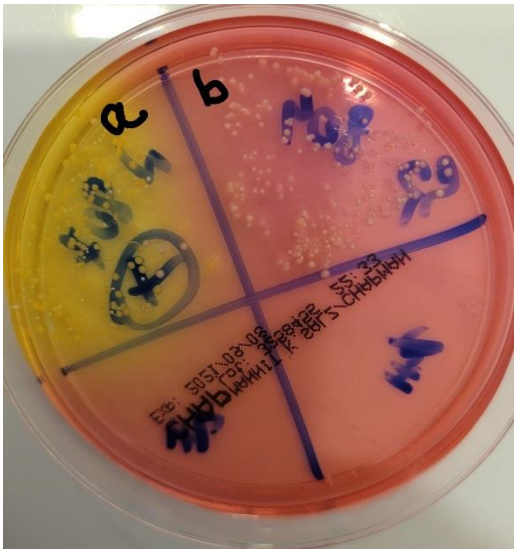


Figura 3. Mediu Chapman a) stafilococi coagulazo-pozitivi și b) stafilococi coagulazo-negativi

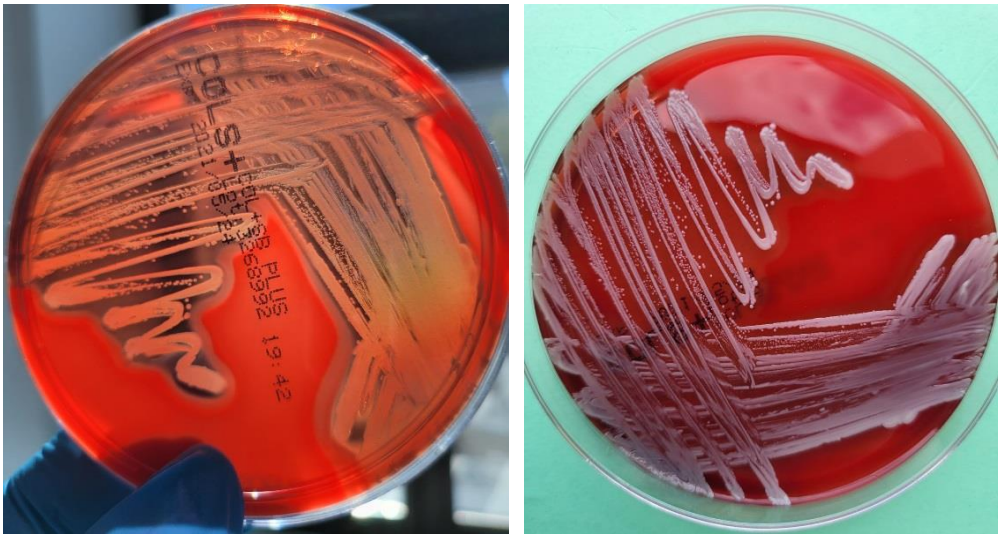


Figura 4. *Staphylococcus aureus* – geloză sânge: *Staphylococcus epidermidis* – geloză sânge

Determinanții de patogenitate sunt enzime extracelulare și toxine stafilococice.

- Coagulaza, principalul factor de patogenitate la *S.aureus*, determină formarea din plasmă a unui coagul împiedicând acțiunea în focarul infecțios a factorilor de apărare; la *S.aureus* este prezentă coagulaza liberă evidențiabilă prin reacția în tuburi și coagulaza legată evidențiabilă prin reacția pe lamă.

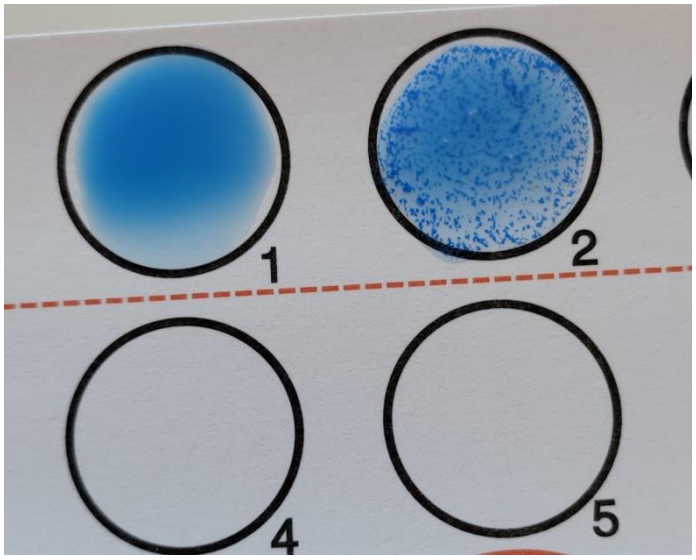


Figura 5. Testul coagulazei – *S. aureus*

- Fibrinolizina sau stafilochinaza lizează rețeaua de fibrină, permițând progresia stafilococilor în țesuturile învecinate; se poate pune în evidență folosind un mediu de cultură preparat cu plasmă umană oxalatată (mediul opac se va clarifica în jurul coloniei).

- hemolizinele cu acțiune hemolitică și dermonecrotică se pun în evidență în culturi pe medii cu sânge.

- enterotoxinele, elaborate în mai multe variante antigenice, sunt identificabile prin reacție de imunodifuzie în gel.

Lizogenie și lizotipie fagică. Susceptibilitatea tulpinilor de stafilococ la acțiunea litică a bacteriofagilor este importantă pentru caracterizarea anumitor particularități ale diferitelor suișe (bacteriile din grupul 2 fagic au afinitate pentru țesutul dermic, cele din grupul 3 fagic sunt penicilino și meticilino rezisten- te). Lizotipia fagică se urmărește pe agar nutritiv pe care s-a însămânțat în pânză tulpina de identificat, care a fost apoi supusă acțiunii diferiților fagi.

Antibiograma - finalizează diagnosticul și este esențială pentru conturarea unei scheme terapeutice eficiente. Administrarea la întâmplare a antibioticelor poate conduce la selectarea unor tulpini multirezistente.

În cazul infecțiilor tegumentare recidivante se poate indica prepararea și administrarea autovaccinului.

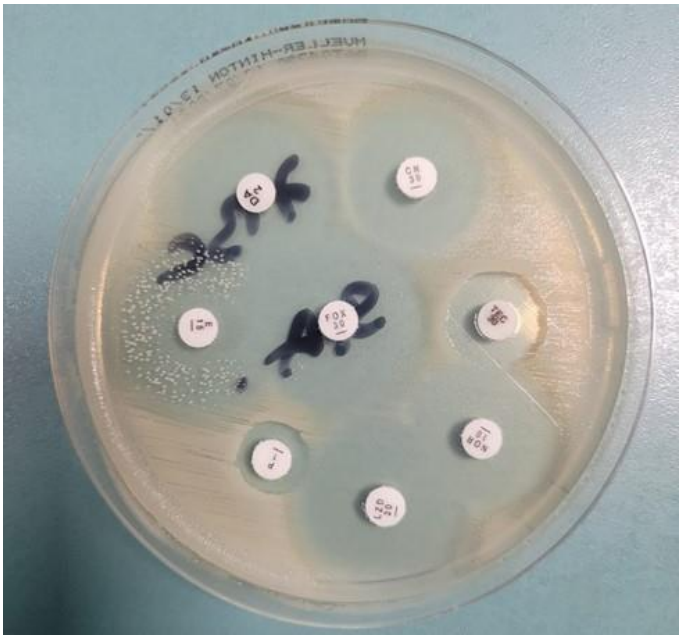


Figura 6. Antibiogramă difuzimetrică – *S. aureus*

1.2. Genul *Streptococcus*

Genul *Streptococcus* cuprinde coci Gram pozitivi grupați în perechi sau lanțuri de dimensiuni variabile, catalazo-negativi, imobili, nesporulați. Streptococii sunt prezenți în apă, aer, sol sau ca și comensali la nivelul tegumentelor sau mucoaselor la om și la animale.

Clasificarea streptococilor se poate face după mai multe criterii, cele mai importante fiind: producerea sau nu a hemolizei pe geloză sânge și structura antigenică determinată de antigenele din peretele bacterian.

Infecții streptococice

□ Infecții cu streptococi de grup A (*Streptococcus pyogenes*):

• infecții acute: respiratorii și cutanate

● infecțiile respiratorii:

✓ 0 acute neeruptive = faringita și anginele

✓ 0 acute eruptive = scarlatina

● infecții cutanate: intertrigo (infecția unui pliu), impetigo (dermatită buloasă), ectima (un impetigo al adultului cu localizare la membrele inferioare), erizipelul (o dermo-hipodermită acută localizată mai frecvent la membrele inferioare și caracterizată prin febră - 39°C, frison, placarde cutanate eritematoase și adenopatie regională).

• complicații precoce supurative:

● după infecții respiratorii pot să apară limfadenita cervicală, pleurezii, pneumonii, mastoidite, otite, sinuzite.

● după infecții cutanate - celulite, miozite, fasceite necrozante

• complicații tardive nesupurative:

● după infecții respiratorii: cardită reumatismală, reumatismul articular acut, purpura reumatoidă, eritem nodos, coreea Sydenham.

□ Infecții cu streptococi de grup B (*Streptococcus agalactiae*):

• infecții neonatale, la nou-născuții din mame infectate sau urmare a contaminării nosocomiale.

• bacteriemii urmare a endometritei sau a supurației plăgii cezariene.

• septicemia se asociază frecvent cu avortul septic.

• alte infecții: otite, traheobronșite, infecții urinare etc.

□ Infecții cu streptococi de grup D și cu *Enterococcus spp*:

• infecții urinare, genitale și perineale, endocardite, supurații ale plăgilor chirurgicale, otite și sinuzite, apendicite și peritonite, infecții biliare.

□ Infecții cu streptococi de grup C și G (comensali ai faringelui):

• infecții ale tractului respirator superior, infecții cutanate, infecții genitale, artrite purulente, meningite.

□ Infecții cu *Streptococcus pneumoniae*:

✓ pneumonia lobară acută,

✓ alte infecții: meningite purulente, bronșite, pleurezie, pericardite, sinovite, faringite, infecții oculare, artrite, endocardite, peritonite.

□ Infecții cu streptococi orali:

• endocardite, pneumopatii, valvulopatii (specificul infecțiilor orale este tratat separat la capitolul Microbiologia cavității orale).

Diagnosticul de laborator al infecțiilor streptococice

Diagnosticul bacteriologic:

Recoltarea probelor patologice se face în funcție de localizarea infecției.

Examenul microscopic direct se face în frotiul colorat Gram. Uneori nu are utilitate, alteori poate da informații orientative, în timp ce în unele situații poate avea o mare valoare diagnostică (de exemplu – în cursul unei pneumonii, un frotiu din spută care pune în evidență diplococi Gram pozitivi capsulați având formă de vârf de lance, ne orientează spre diagnosticul unei pneumonii pneumococice).

Izolarea

• pe agar sânge - pentru majoritatea streptococilor.

• pe agar nutritiv pentru enterococi.

• pe agar chocolat (sau agar sânge), cu incubare în atmosferă cu 10% CO_2, pentru pneumococi.

Identificarea

● **proprietăți morfotinctoriale:** coci Gram pozitivi, în lanțuri de lungimi variabile; pentru *Streptococcus pyogenes* aspectul frotiului este caracteristic din culturile dezvoltate în bulion glucozat.

● **proprietăți de cultură:** *Streptococcus pyogenes* formează pe agar sânge colonii de tip S, punctiforme, înconjurate de o zonă de hemoliză completă (beta hemoliză).

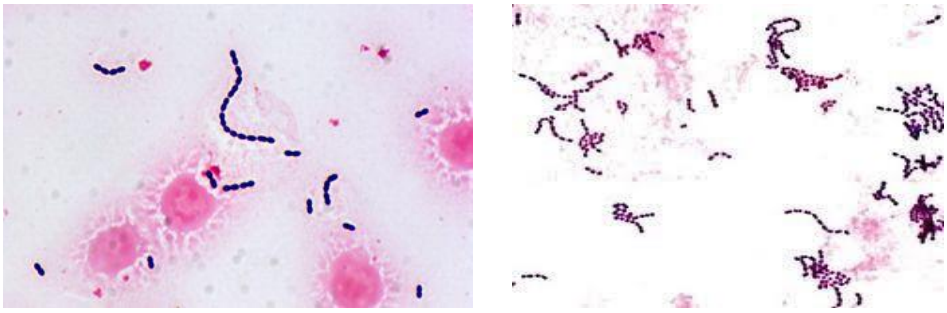


Figura 7. Frotiuri - *Streptococcus pyogenes*

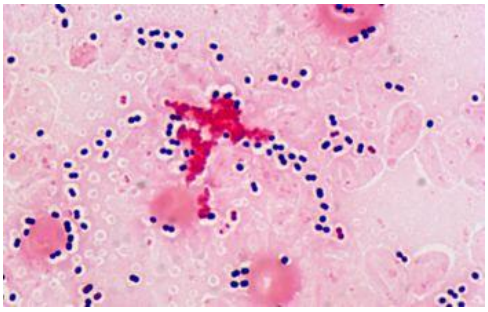


Figura 8. Frotiu - *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae formează colonii de tip S (tulpinile încapsulate), înconjurate de o zonă de hemoliză α de culoare verzuie pe geloza sânge și respectiv galben-verzuie pe geloza chocolat.

Enterococii formează colonii de tip S nehemolitice pe geloza sânge, în timp ce pe mediul bilă-esculină apar negre ca urmare a hidrolizei esculinei.

Figura 9. *Streptococcus pyogenes* – geloză sânge (SV); diferența între *S. pyogenes* și *S. aureus* (SP)

● **proprietăți biochimice:** sunt lipsite de importanță pentru identificarea streptococilor piogeni; sunt utile pentru identificarea enterococilor și pneumococilor.

- enterococii (și streptococ grup D) se dezvoltă la temperaturi între 10-40°C, în timp ce **pneumococii necesită temperatura de 37°C** (cu incubare în atmosfera cu 10% CO_2).
- enterococii se dezvoltă pe medii cu: 6, 5% NaCl, 40% bilă și 0, 1% albastru de metilen; pneumococii nu se dezvoltă pe astfel de medii și în plus se lizează în prezența bilei.
- pneumococii sunt extrem de sensibili la acțiunea optochinului.

● **proprietăți antigenice**:

- grupele antigenice importante pentru patologia umană sunt: A, B, C, D, F, G.
- apartenența la grupul antigenic se poate face prin:

✓ testul la Bacitracină care permite încadrarea în grupul antigenic A;

Figura 10. Testul la Bacitracină

✓ testul CAMP pentru încadrarea în grupul antigenic B (tulpinile streptococice din acest grup produc factorul CAMP și măresc zona de hemoliză produsă de o tulpină de stafilococ utilizată la realizarea testului).

✓ latex-aglutinarea folosește anticorpi antigrup streptococic fixați pe particule de latex.

• pneumococii au peste 80 de tipuri antigenice identificabile prin reacții de aglutinare sau prin testul de umflare a capsulei.

a)

b)

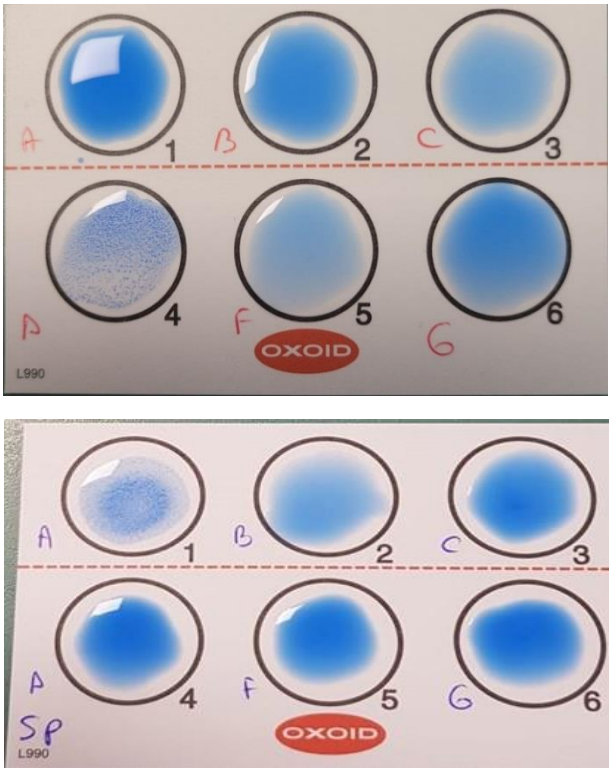


Figura 11. STREPTIC – a) streptococ de grup D și b) streptococ de grup A

● **proprietăți de patogenitate**:

• la pneumococi: capsula și pneumolizina (o hemolizină)

Antibiograma este obligatorie pentru toți streptococii, în pofida faptului că streptococii de grup A sunt întotdeauna sensibili la penicilina de grup G.

Figura 12. Antibiograme *Streptococcus spp.* pe geloză sânge

Diagnosticul serologic:

Se face prin reacția ASLO care pune în evidență prezența anticorpilor antistreptolizină O. Un titru care depășește 200 unități ASLO se va interpreta ca infecție streptococică recentă și va impune profilaxia complicațiilor.

2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci gram negativi și bacili gram pozitivi aerobi ai cavității orale

2.1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de coci gram negativi

Genul *Neisseria*

Genul Neisseria cuprinde diplococi Gram negativi, imobili, de aspect reniform, așezați în diplo. Sunt bacterii care produc catalază și oxidază.

Genul reunește atât specii patogene cât și specii comensale. Neisseriile patogene sunt reprezentate prin *Neisseria gonorhoeae* (gonococul) și *Neisseria meningitidis* (meningococul).

2.1.1. Neisseria gonorhoeae determină infecții cu transmitere sexuală, care la bărbat se manifestă ca și uretrită acută, care greșit tratată sau netratată devine subacută, și în evoluție se complică cu prostatită, epididimită și orhită. Pe termen lung, urmare a diseminării hematogene se poate instala artrita. La femeie cel mai frecvent apare cervicita și colpita fără manifestări clinice evidente. În timp, infecția se complică cu salpingită. Și la femeie se poate instala artrita ca și complicație tardivă.

La nou-născut există posibilitatea instalării infecției consecutiv străbaterii filierei pelvi-genitale materne, fapt care conduce la instalarea unei oftalmii purulente, care are ca și consecință cecitatea.

Diagnosticul de laborator

Recoltarea probelor patologice:

• la bărbat se recoltează secreție uretrală dimineața, înainte de micțiune, folosind fie ansa bacteriologică, fie tamponul uretral.

• la femeie recoltarea se face la nivelul colului uterin, din fundul de sac vaginal posterior și de la nivelul orificiului de deschidere al glandelor Bartholin.

Examenul microscopic direct este util numai din secreția uretrală. Se poate face fie în colorația simplă cu albastru de metilen, fie în colorația Gram. Se pun în evidență diplococi reniformi, Gram negativi (în colorația Gram) și numeroase polimorfonucleare. În infecțiile subacute diplococii apar fagocitați, iar în infecțiile cronice lipsesc polinuclearele, și cu destulă dificultate se pot pune în evidență diplococii care colonizează celule sau fragmente de celule epiteliale.

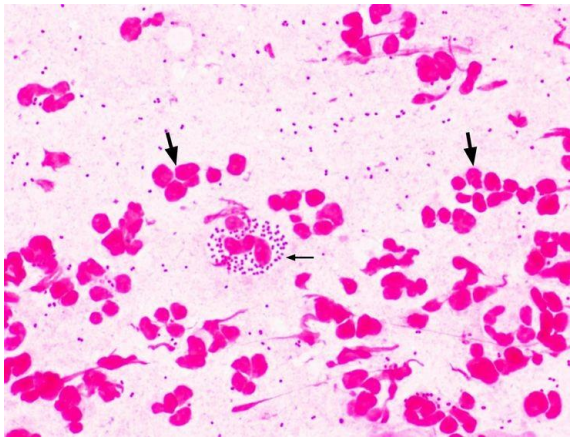


Figura 13. Frotiu din produs patologic – *Neisseria gonorhoeae*

Izolarea se realizează pe geloză chocolat, **se incubează în atmosferă cu 10% CO_2.**

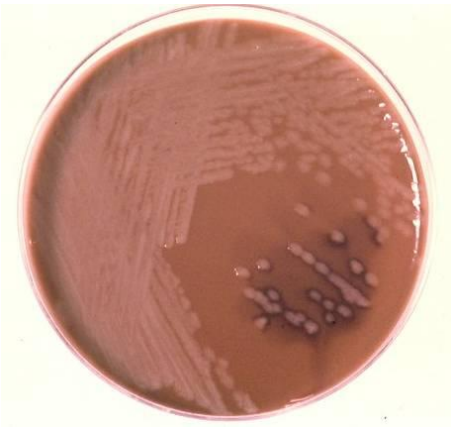


Figura 14. *Neisseria gonorhoeae* pe geloză chocolat

Identificarea se bazează pe proprietățile morfotinctoriale (diplococi reniformi Gram negativi), caracterele de cultură (colonii mici, de tip S, gri, transparente), proprietățile biochimice (produce oxidază, catalază, degradează glucoza dar nu și maltoza), proprietățile de patogenitate (cu prezența endotoxinei, a pililor care asigură colonizarea mucoaselor, a capsulei polizaharidice).

Antibiograma este obligatorie pentru conturarea schemei terapeutice.

2.1.2. Neisseria meningitidis este un agent etiologic specific uman, izolabil din rinofaringele purtătorilor sănătoși, iar în cazul bolii clinic manifeste de la nivelul lichidului cefalorahidian.

Meningococii pătrund în organismul uman pe cale aerogenă și determină inițial o rinofaringită subclinică sau clinic manifestă. Dacă depășesc bariera mucoasă pătrund în sânge și determină bacteriemie. Sub acțiunea factorilor de apărare

nespecifică - interferonii, sau specifică - anticorpii antimeningocici infecția se poate opri în acest stadiu. În condiții de scădere a rezistenței generale a organismului, meningococii depășesc bariera hemato-encefalică și se localizează la nivelul învelișurilor meningeale, determinând meningita meningococică.

Diagnosticul de laborator se face pe baza examenului direct bacteriologic.

Recoltarea probelor patologice:

• se recoltează LCR prin puncție lombară (înainte de instituirea tratamentului chimioterapic),

• în meningitele bacteriene, în general, și în cea meningococică în special, LCR este purulent (spre deosebire de meningitele virale în care LCR este clar și doar ușor hipertensiv - în meningita bacilară aspectul LCR este asemănător cu cel din meningitele virale).

Examenul microscopic direct:

• citologic preliminar realizează numărătoarea celulelor și folosește camere de numărare care se folosesc și pentru leucocite (se face pe LCR necentrifugat).

• pe LCR centrifugat se completează examenul citologic în frotiuri colorate Giemsa sau în colorație simplă cu albastru de metilen (în meningitele bacteriene predomină polimorfonuclearele, în timp ce în meningitele virale, dar și în meningita bacilară, predomină limfocitele). Pentru exclude- rea definitivă a etiologiei bacilare se face frotiu în colorația Ziehl-Nielsen.

Informații esențiale se obțin în frotiul colorat Gram: în cazul infecției meningococice frotiul pune în evidență diplococi reniformi Gram negativi predominant fagocitați.

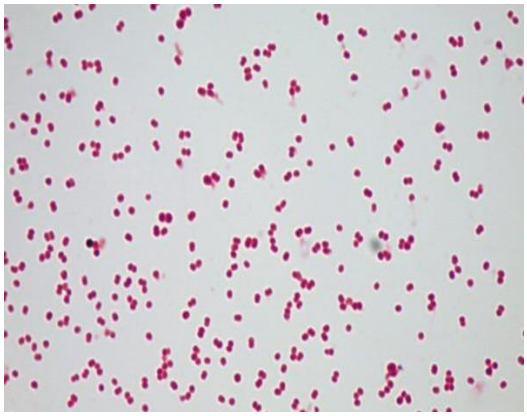


Figura 15. Frotiu – cultură *Neisseria gonorhoeae*

Izolarea se face pe geloză Muller-Hinton sau geloză chocolat (medii preîncălzite la 37°C), incubându-se în atmosferă cu 10% CO_2.

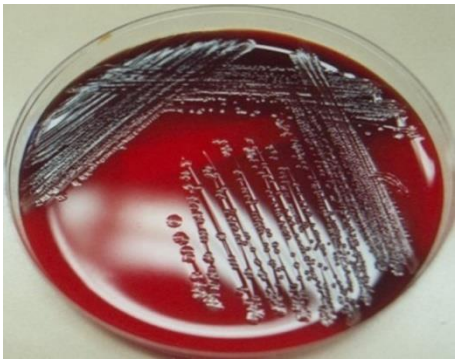


Figura 16. *Neisseria gonorhoeae* pe geloză sânge

Identificarea se bazează pe cercetarea proprietăților morfotinctoriale (frotiul colorat Gram evidențiază diplococii Gram negativi), cercetarea caracterelor de cultură (colonii de tip S, nepigmentate și nehemolitice, de dimensiuni foarte mici care se prezintă sub aspectul picăturilor de rouă), pe proprietățile biochimice (cu producerea catalazei și a oxidazei, metabolizarea glucozei și maltozei) și a proprietăților antigenice identificabile prin lațex aglutinare și imunofluorescență (serogrupele fiind notate cu litere majuscule - A, B, C, 29E, X, Y, Z, W135), și a proprietăților de patogenitate (endotoxina, capsula, proteinele de membrană externă și pilii).

Antibiograma se realizează prin metoda difuzimetrică pe Muller Hinton cu sânge.

2.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili gram pozitivi aerobi

2.2.1. Bacili gram pozitivi aerobi nesporulați

Genul *Corynebacterium*

Genul *Corynebacterium* reunește un grup de bacterii care prezintă următoarele caracteristici sunt bacili Gram-pozitivi usor încurbați cu una sau ambele extremități măciucate, așezați în palisade, imobili, nesporulați, necapsulați aerobi, uneori microaerofili sau facultativ anaerobi.

Corynebacterium diphteriae, agentul cauzal al difteriei, a fost acceptat ca și specie tip, nu numai datorită importanței sale ca și agent patogen al difteriei, dar

și pentru caracteristicile sale bine definite, care-i conturează biologia.

Diagnosticul bacteriologic:

1. Recoltarea probelor patologice.

Se face cu ajutorul a trei tampoane (se recoltează exsudatul faringian).

2. Examenul microscopic direct

Din primul tampon faringian se fac două frotiuri, unul fiind colorat Gram, iar celălalt în colorația specială Neisser. Frotiul colorat Gram evidențiază bacili Gram pozitivi, așezați în palisade. Frotiul colorat Neisser servește la evidențierea corpusculilor metacromatici Babeș-Ernst.

3. Izolarea

Produsul patologic se însămânțează pe mediul Löffler, pe mediu cu telurit de potasiu Tinsdale pe care bacilul difteric se dezvoltă sub formă de colonii mici, brune, înconjurate de un halou negru. Pe mediul Löffler coloniile sunt de tip R cu contur neregulat și au aspect de floare de margaretă (pentru tipul gravis).

4. Identificarea

4.1. Caracterele morfotinctoriale: sunt reprezentative în frotiul efectuat de pe mediul Löffler - bacili Gram pozitivi, drepți sau ușor încurbați, cu una sau ambele extremități măciucate. În colorația Neisser se evidențiază corpusculii metacromatici Babeș-Ernst (corpusculii se colorează în albastru violet iar corpul bacterian în galben brun).

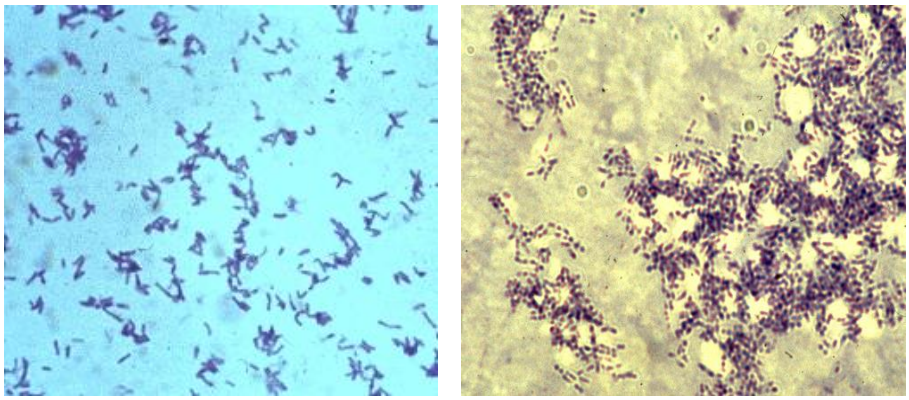


Figura 17. Frotiuri *Corynebacterium diphteriae*

4.2. Caractere de cultură

În medii lichide *tipul gravis* lasă mediul limpede și formează peliculă, *tipul mittis* tulbură uniform mediul, iar *tipul intermedius* formează un inel aderent și sediment granular.

Pe mediul Gundel-Tietz: *tipul gravis* formează colonii de 1-2 nun cu marginea crenelată cu suprafața neregulată și de consistență friabilă, care dau aspectul de floare de margaretă; *tipul mittis* formează colonii de mărimi variabile cu suprafață convexă și lucioasă, conturul regulat și de consistență cremoasă; *tipul intermedius* formează colonii de talie variabilă, ce prezintă o suprafață ușor acu- minată, marginile circulare și de consistență semicremoasă.

Pe mediul Tinsdale, diftericii formează colonii negre, înconjurate de un halou brun, în timp ce pseudodiftericii formează tot colonii negre dar fără halou.

Figura 18. *Corynebacterium diphteriae* pe mediu Tinsdale

4.3. Caractere biochimice

Sunt utile pentru diferențierea diftericului de pseudodifterici dar și pentru identificarea tipurilor de difterici (se urmărește fermentarea amidonului, glicogenului și a dextrinei).

Bacilul difteric (toate tipurile) produce hidrogen sulfurat și nu scindează ureea. Pseudodiftericii scindează ureea, în schimb nu produc hidrogen sulfurat.

4.4. Proprietăți de patogenitate.

Factorul de patogenitate este reprezentat de toxina difterică. Toxina difterică acționează prin blocarea sintezei proteice.

Testele de patogenitate pot fi realizate *in vitro* (testul Elek), sau *in vivo* prin inocularea la cobai. Inocularea la cobai se realizează prin administrarea subcutanată a unei culturi de 48 h de bacil difteric. Se folosesc animale protejate și neprotejate. Cobaiul neprotejat (prin ser antidifteric) moare în 1-4 zile de la inoculare prezentând ca și leziuni caracteristice : edem gelatinos la locul inocularii, revărsate sanguinolente în seroase și congestia suprarenalelor (cu aspect de cireașă).

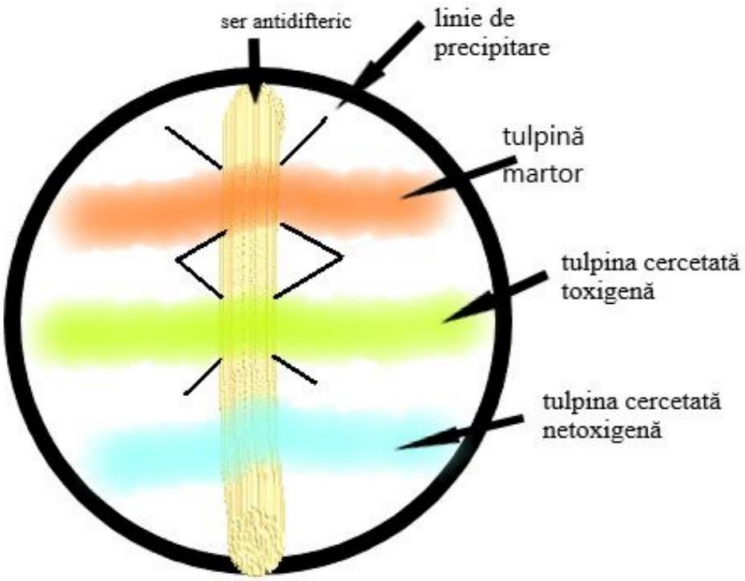


Figura 19. Testul Elek

Inocularea toxinei la cobai a permis stabilirea unității de măsură *in vivo* pentru toxina difterică, care este reprezentată de doza limită mortală (DLM). Un DLM de toxină difterică reprezintă acea cantitate de toxină care omoară un cobai în greutate de 250 g în timp de 4 zile cu leziunile caracteristice descrise anterior.

Diagnosticul serologic- se realizează prin reacția de hemaglutinare pasivă.

Biologic- este utilizat pentru testarea stării de imunitate în colectivități. Constă în IDR Shick: se inoculează intradermic toxina și se citește reacția după 24 de ore. Apariția unui eritem la locul inocularii este o reacție pozitivă care dovedește lipsa anticorpilor antitoxici și deci susceptibilitatea persoanei respective la infecție; aceste persoane se vaccinează cu anatoxină difterică. Lipsa eritemului (reacție negativă) este datorată neutralizării toxinei de către anticorpi specifici, fapt ce indică prezența imunității.

Profilaxia în difterie se bazează pe administrarea vaccinului antidifteric (anatoxina difterică - în trivaccinul DTP, sau în bivaccinul DT).

2.2.2. Bacili gram pozitivi aerobi sporulați

Genul *Bacillus*

Bacteriile din genul *Bacillus* sunt bacterii Gram pozitive, cu capetele tăiate drept, dispuse în lanțuri, aerobe, în general mobile (*Bacillus anthracis* este întotdeauna mobil, sporulate (diametrul sporului, care are o localizare centrală, este mai mic decât diametrul bacteriei, astfel că celula bacteriană nu este deformată).

Toți reprezentanții acestui gen sunt foarte răspândiți în natură datorită sporului care le conferă rezistență în mediul exterior; sunt germeni telurici găsindu-se în special în sol, dar numeroase specii de *Bacillus* pot fi găsite în apă, aer sau pe materiale de origine animală și vegetală.

Bacillus subtilis - de regulă este o specie saprofită, însă a fost izolat în conjunctivite, iridociclite, sinuzite cronice și al infecțiilor urinare.

Bacillus cereus - în cazul în care se înmulțește excesiv în alimente se poate constitui în agent etiologic al unor toxiinfecții alimentare (fosfolipaza C hidrolizează lecitina din alimente și produce fosforilcolină activă). Specia a mai fost izolată în cursul bacteriemiilor cu localizări meningeale și pulmonare.

Bacillus anthracis este agentul etiologic al antraxului- o antropozoonoză, care poate îmbrăca diferite forme clinice:

– antrax cutanat - pustula malignă (96% din cazuri), cu localizare predilectă la nivelul feței și a membrelor; la locul de inoculare apare o veziculă cu conținut serosanguinolent, urmată de o ulcerație-mică care se usucă și dă naștere unei cruste de culoare neagră, de unde și denumirea de cărbune cutanat. Regiunea subiacentă leziunii prezintă un edem gelatinos, nedureros.

- ✓ Edemul malign este forma cea mai gravă de manifestare a cărbunelui cutanat și se caracterizează printr-un edem extins, febră ridicată și stare toxică.

– antrax visceral

- forma pulmonară,
- forma gastro-intestinală
- meningita cărbunoasă

Diagnosticul este bacteriologic

1. Recoltarea: în formele cutanate se recoltează serozitate din vezicule; în infecția pulmonară se recoltează spută; în infecțiile digestive se recoltează materii fecale și în meningită- LCR. De la animalele moarte, suspecte de infecție cărbunoasă, se recoltează țesuturi.

2. Examenul microscopic direct: evidențiază bacili Gram pozitivi, mari, capsulați, izolați sau dispuși sub formă de lanțuri scurte.

3. Izolarea. Bacteria este puțin pretențioasă, dezvoltându-se ușor pe medii uzuale. Probele patologice se însămânțează pe geloza sânge pe care *Bacillus anthracis* se dezvoltă sub formă de colonii rugoase (de tip R) cu margini neregulate, care au aspect de cap de meduză sau coamă de leu (pe mediile cu sânge coloniile sunt nehemolitice).

4. Identificarea:

4.1. Proprietăți morfotinctoriale: în frotiu colorat Gram se evidențiază bacili Gram pozitivi cu capetele tăiate drept, prezentând aspectul bețelor de bambus.

Dispoziția sporului este centrală, iar diametrul mai mic decât al celulei vegetative face ca aceasta să nu fie deformată.

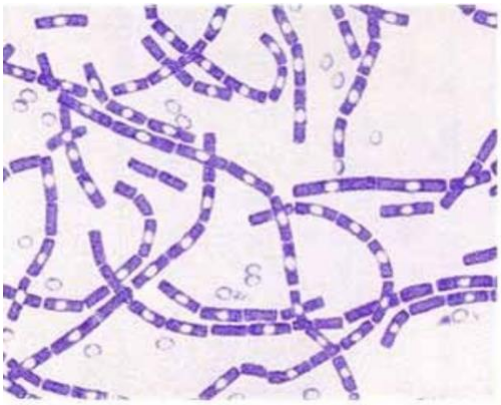


Figura 20. Frotiu colorat Gram - *Bacillus anthracis*

În colorat cu safranină și verde malachit se pot pune în evidență sporangiile (formele vegetative) colorate în roșu precum și sporii colorați în verde.

4.2. Caractere de cultură - crește bine pe medii uzuale în condiții de aerobioză.

- agar nutritiv - colonii mari, alb-cenușii, cu suprafață rugoasă, margini neregulate și prezentând prelungiri laterale ca niște șuvițe de păr care conferă coloniilor un aspect caracteristic; sunt coloniile de tip R; în culturile atenuate la 42, 5°C pot să apară colonii de tip S (tulpini atenuate).
- agar sânge - același aspect al coloniilor, nehemolitice.

Figura 21. *Bacillus anthracis* – colonii caracteristice, cu aspect de „cap de meduză”

- bulion nutritiv – tulpinile de tip R lasă mediul de cultură limpede și formează un depozit floconos.

4.3. Caractere biochimice – zaharolitic, slab proteolitic, lichefiază gelatina.

4.4. Proprietăți antigenice – prezintă un antigen capsular de natură polipeptidică și două antigene de perete celular.

4.5. Caractere de patogenitate

Toxina este formată din antigenul protectiv (PA) și din: fie factorul letal LF fie factorul edemațiant (EF); antigenul protectiv se leagă de receptori și translocă în citosol LF sau EF.

In vitro demonstrarea patogenității unei sușe de *Bacillus anthracis* se poate realiza prin teste imunocromatografice.

5. Profilaxia folosește vaccinarea anticărbunoasă

6. Tratamentul chimioterapie folosește betalactamine și quinolone.

3. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de enterobacterii

Familia *Enterobacteriaceae* cuprinde bacili Gram negativi fermentativi (degradează glucoza pe cale oxidativă și fermentativă) și include 44 genuri, dintre care 25 au fost implicate în patologia umană.

Sunt bacili cu capetele rotunjite, de dimensiuni medii, cu dispoziție în general necaracteristică. La *Klebsiella* bacilii sunt dispuși în diplo, în sensul lungimii. Speciile de *Yersinia* sunt mai frecvent cocobacilare, colorate bipolar, *E. coli* sunt pleiomorfi, iar speciile de *Proteus* sunt uneori extrem de polimorfe. Pot fi mobili sau imobili. Nu sporulează. Majoritatea enterobacteriilor sunt necapsulate. Unele pot avea o capsulă proeminentă (*Klebsiella*), iar altele (*Salmonella, E. coli*) pot fi învelite de un material capsular.

Enterobacteriile sunt germeni aerobi, facultativ anaerobi, nepretențioși nutritiv.

Semnificația clinică: sunt germeni ubicuitari, iar majoritatea (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* etc.) fac parte din flora normală a organismului și pot produce infecții oportuniste. Unele specii, ca de pildă *Salmonella* Typhi, *Shigella* spp. - au habitat exclusiv uman.

În funcție de patogenitate, enterobacteriile se împart în: înalt patogene (*Salmonella, Shigella, Yersinia*), condiționat-patogene (*E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Serratia, Citrobacter*) sau lipsite de importanță în patologia umană.

Enterobacteriile produc **infecții intestinale și extraintestinale,** sau mai rar, pot apărea **infecții generalizate** pe un fond de rezistență scăzută a organismului, reprezentând 80% din totalitatea bacililor gram negativi izolați și peste 50% din totalul germenilor izolați. De asemenea, sunt implicate în etiologia a 30-35% din septicemii, în peste 70% din infecțiile urinare și în majoritatea toxiinfecțiilor alimentare. Sunt cauză frecventă a infecțiilor nosocomiale – infecții asociate asistenței medicale.

Recoltarea. *Recoltarea probelor în infecțiile extraintestinale* depinde de localizarea infecției. În *infecțiile intestinale* se recoltează materii fecale. Acestea trebuie recoltate cât mai aproape de debutul infecției, preferabil din scaunele spontane

Examenul direct al materiilor fecale. Examenul macroscopic este important, deoarece materiile fecale purulente și muco-sanguinolente orientează diagnosticul spre o infecție cu *Shigella* (dizenterie). *Examenul direct microscopic* nu intră în rutina laboratoarelor.

Izolarea. Sunt germeni nepretențioași nutritiv, care se dezvoltă cu ușurință pe mediile uzuale (bulion, geloză, geloză-sânge), dar și pe mediile selective lactozate (Mac Conkey, AABTL, ADCL, XLD, Istrati-Meitert), pe care putem diferenția enterobacteriile lactozo-pozitive de cele lactozo-negative.

Tulbură uniform mediile lichide (bulionul). Pe medii solide se dezvoltă sub formă de colonii S sau R. Între cele două tipuri pot exista și forme intermediare, sau uneori colonii mucoase de tip M (*Klebsiella*, unele tulpini de *E. coli*). Genul *Proteus* prezintă fenomenul de invazie pe medii neselective solide (geloză, geloză-sânge). Coloniile de *Yersinia* se dezvoltă mai lent, fiind minuscule după 18 ore de incubare.

Produsele extraintestinale care în mod normal sunt sterile, se însămânțează pe medii obișnuite cum este geloza sânge. Produsele puțin contaminate, cum sunt puroiul, sputa se însămânțează și pe un mediu selectiv lactozat, cum este mediul MacConkey. Materiile fecale se însămânțează în mod obligatoriu pe mai multe medii de cultură:

- un mediu de îmbogățire - bulion cu selenit acid de sodiu (Leifson), bulion cu tetrationat (Muller-Kauffmann),
- un mediu slab selectiv - MacConkey, agar EMB (Levin),
- un mediu moderat selectiv – ADCL (Leifson), agar Hectoen, agar XLD, agar SS (*Salmonella–Shigella* agar),
- eventual un mediu foarte selectiv, ca de pildă, mediul Wilson-Blair pentru salmonele.

Identificarea enterobacteriilor se bazează pe studiul caracterelor biochimice, ele constituind criterii importante de identificare a genului/speciei.

Enterobacteriile prezintă unele caractere biochimice comune, care le permit încadrarea în familia *Enterobacteriaceae*: fermentează glucoza, reduc nitrații la nitriți, sunt catalazo-pozitivi și oxidazo-negativi.

Unele enterobacterii fermentează lactoza, altele nu, fermentarea lactozei fiind un criteriu practic de diferențiere preliminară a lor. Astfel, utilizarea mediilor selective lactozate permite diferențierea enterobacteriilor lactozo-pozitive (*E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia*) de cele lactozo-negative (*Salmonella, Shigella, Proteus, Yersinia*).

Bacilii din genul ***Salmonella*** prezintă:

- *caractere morfologice*. se evidențiază bacili gram-negativi, cu dimensiuni de 2-3 μm, cu dispoziție necaracteristică.

- *caractere culturale:* colonii S lactozo-negative

- *caractere biochimice*: fermentează glucoza (G+), nu fermentează lactoza (L), produce H_2S, citrat +,

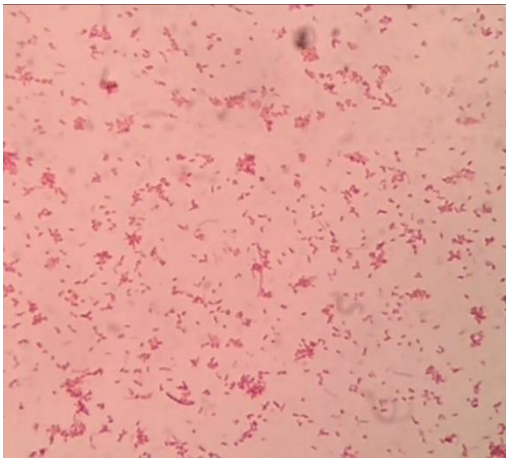


Figura 22. Frotiu *Salmonella spp.*

a) b)

Figura 23. *Salmonella spp.* pe a) geloză sânge și b) mediu cromogenic UTI

Figura 24. *Salmonella spp.* pe mediu SS

Figura 25. *Salmonella spp.* pe mediu MacConkey

iar cei din genul ***Shigella*** :

- *caractere morfotinctoriale :* bacili G-, imobili
- *caractere culturale*. colonii S lactozo-negative
- *caractere biochimice*: coloniile lactozo-negative vor fi identificate pe baza testelor biochimice, care permit încadrarea lor în genul *Shigella:* G+, L-, H_2S-, citrat- etc.

Testele biochimice se efectuează pe medii turnate în eprubete mici, care după însămânțare se termostatează 24 de ore. Există și produse comerciale gata preparate ca, de pildă, sistemele microtest – API 10E, sistem automat Vitek, MicroScan sau spectrometria de masă **MALDI-TOF.** Mediile minimale pentru identificarea biochimică a enterobacteriilor sunt:

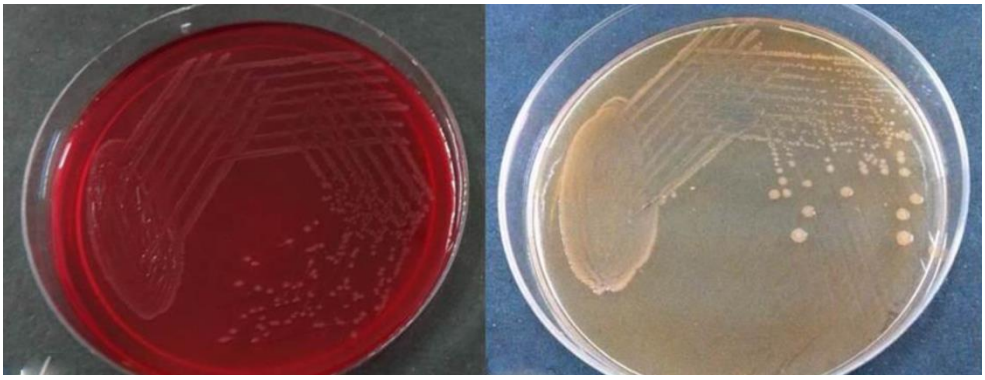
• *geloza TSI*-pe care se testează fermentarea glucozei, lactozei, precum și producerea de H_2S și gaz.

• *mediul MIU* pentru cercetarea mobilității, prezenței indolului și ureazei.

• *reacția roșu metil (RM)*

• *utilizarea citratului de sodiu ca sursă unică de carbon*

•*testul fenilalanindezaminazei (FAD)* – pozitiv la tulpinile de *Proteus/ Providencia/Morganella* spp.



a) b)

Figura 26. *Shigella spp.* a) mediu XLD și b) MacConkey

Sensibilitatea la antibiotice. Determinarea sensibilității la antibiotice este obligatorie, deoarece enterobacteriile au dobândit, relativ repede, rezistență la o serie de antibiotice, cel mai frecvent prin transfer de plasmide. Dacă nu este posibilă antibiograma, medicul care prescrie antibioticul trebuie să cunoască rezistența naturală, genetică a enterobacteriilor și să fie orientat asupra rezistenței dobândite la tulpinile circulante în acea zonă.

Dintre enterobacteriile frecvent întâlnite în practica medicala studiem mai în detaliu următoarele :

3.1. Genul *Escherichia*

Genul *Escherichia* include mai multe specii, dintre care, singura de interes medical este *Escherichia coli*.

E. coli este un bacil gram negativ, scurt, cu capetele rotunjite, nesporulat, necapsulat, în general mobil (cu cili peritrichi). Este aerob, facultativ anaerob. Face parte din flora normală a intestinului la om și animale, reprezentând aproximativ 80% din flora rezidentă, aerobă, a colonului. Are un cu rol important în sinteza unor vitamine din grupul B și K și în menținerea unui echilibru în biocenoza intestinului.

Semnificația clinică. Sunt germeni condiționat-patogeni, fiind cei mai izolați microbi în laboratorul de bacteriologie. În anumite condiții, mai ales când scade rezistența locală sau generală a organismului, produc infecții cu localizare și gravitate diferită, grupate în:

a. infecții enterale

b. infecții extraenterale.

a. Infecțiile enterale - se realizează prin consumul unor alimente în care *E. coli* s-a multiplicat (toxiinfecții alimentare) sau prin consum de apă cu contaminare fecală intensă (infecții hidrice).

Sunt produse de 6 patotipuri diareigene de *E. coli*: enterotoxigen (ETEC), enteroinvaziv (EIEC), enteropatogen (EPEC), enterohemoragic (EHEC) enteroagregativ (EAggEC) și enteroaderent difuz (DAEC).

Recoltarea. Se recoltează materiile fecale și se trimit imediat la laborator pentru a fi prelucrate.

Izolarea. Materiile fecale se însămânțează pe cel puțin 2 medii selective: un mediu slab selectiv – MacConkey și un mediu moderat selectiv - ADCL sau XLD. Pe aceste medii, care toate conțin lactoză și un indicator de *p*H, bacilul coli dezvoltă colonii lactozo pozitive, a căror culoare este în funcție de *p*H.

Astfel:

- pe mediul MacConkey, pe mediul ADCL - *E. coli* dă colonii rotunde, lucioase de tip S, de culoare roșie, cu un diametru de 2-3 mm,
- pe mediul AABTL, pe mediul Istrati-Meitert, bacilul coli dezvoltă colonii cu aceleași caractere, dar de culoare galbenă.

Este de reținut faptul că din 100 de tulpini de *E. coli*, 95 fermentează lactoza, dar 5 nu.

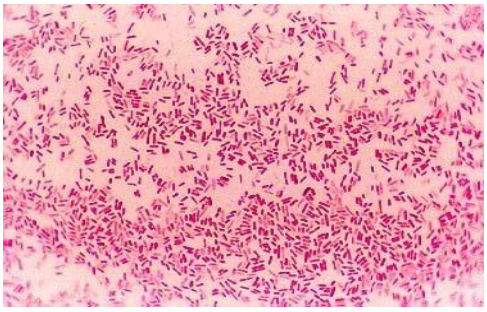


Figura 27. Frotiu - *Escherichia Coli*

a)

b)

c)

Figura 28. *E. coli* pe a) geloză sânge, b) UTI, c) MacConkey

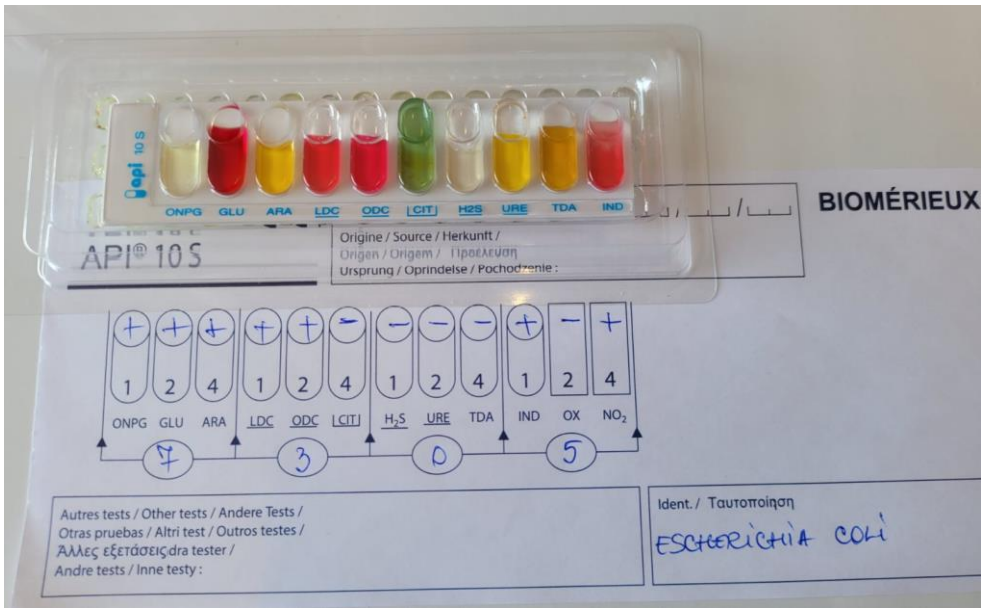


Figura 29. Test API 10S

Identificarea speciei se face pe baza caracterelor biochimice: G+, L+, H2S –, citrat –, Bacilii coli care aparțin grupelor cu patogenitate intestinală nu se deosebesc din punct de vedere cultural și biochimic de tulpinile care se găsesc în mod normal în flora intestinală, de aceea trebuie urmărită structura antigenică.

b. Infecțiile extraenterale produse de *E.coli* sunt numeroase :infecții ale tractului urinar, infecții biliare, infecții respiratorii, infecții ORL, suprainfecții ale plăgilor și arsurilor, septicemii, meningite, mai ales la nou-născuți etc. Unele din infecțiile enumerate - urinare, ale plăgilor chirurgicale - pot lua caracter nosocomial (infecții asociate asistenței medicale).

Ne vom referi în continuare la **diagnosticul infecțiilor urinare**, al căror principal agent etiologic este *E. coli*.

Urocultura cantitativă este singura metodă care stabilește cu certitudine diagnosticul de infecție a tractului urinar.

Recoltarea: urina

Examenul direct. Urina se centrifughează 10 minute la 3000 turații/minut. Din sediment se face un frotiu colorat Gram pe care, într-o infecție urinară, se văd în mod obligatoriu PMN și bacili gram negativi.

Însămânțarea:

Tehnica anselor calibrate. Se utilizează două anse calibrate (una cu diametrul interior de 5 mm și cealaltă de 2,5 mm) astfel încât volumul încărcat de urină omogenizată (nediluată) să reprezinte 0,01 ml, respectiv 0,001 ml. Cu ansa mică

urina se însămânțează pe geloză sânge și cu cea mare pe mediu Mac Conkey. Plăcile se incubează la termostat la 37°C până a doua zi. Numărul de germeni/ ml urină se obține prin înmulțirea numărului de colonii cu 100 (respectiv 1000) și apoi se face media aritmetică.

Interpretarea rezultatelor:

- < 103 UFC/ml (< 1.000 germeni/ml urină) este o bacteriurie nesemnificativă
- 104 (10.000 germeni/ml urină) posibil contaminare din căile urinare inferioare, se recomandă repetarea uroculturii,
- 104 – 105 UFC/ml (între 10.000 - 100.000 germeni/ml urină), suspiciune de ITU, rezultatul este discutabil în funcție de context și germeni identificați, urocultura se poate repeta
- (≥ 105 UFC/ml (≥ 100.000 germeni/ml urină), infecția urinară este certă, daca se izolează o singură specie microbiană.

NOTĂ: Pragul semnificativ pentru o ITU este pentru enterobacterii, *Pseudomonas,* enterococi, de 105 UFC/ml, pentru stafilococi de 5 x 104 UFC/ ml, iar pentru *Candida* de 104 UFC/ml. Identificarea mai multor specii microbiene presupune contaminarea probei și se indică repetarea uroculturii.

Sensibilitatea la antibiotice. *E. coli* este sensibil, în mod natural, la majoritatea antibioticelor, dar foarte multe tulpini au dobândit rezistența la chimioterapice antiinfecțioase prin transferul de plasmide. Antibiograma este, deci, obligatorie pentru toate tulpinile izolate.

3.2. Genul *Klebsiella*

Genul *Klebsiella* cuprinde bacili gram negativi, scurți, cu capete rotunjite, imobili, capsulați, dispuși în diplo în sensul lungimii.

Semnificația clinică. Din cele 10 specii ale genului, 4 sunt importante în patologia umană: *K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozenae* și *K. rhinoscleromatis*.

Sunt germeni condiționat-patogeni, componenți ai florei intestinale la om și animale, iar în număr redus se găsesc și la nivelul mucoasei tractului respirator. Se pot izola din apă, sol, plante.

K. pneumoniae este specia cel mai frecvent izolată din cadrul genului. În cazul scăderii rezistenței antiinfecțioase a organismului (la prematuri și la vârstnici).

Klebsiella poate cauza infecții grave - pneumonii, septicemii și meningite. Este agentul etiologic important al unor infecții nosocomiale (suprainfecția plăgilor chirurgicale, infecții urinare, septicemii). *K. oxytoca* produce infecții similare.

Recoltarea produselor este în funcție de localizarea infecției.

Examenul direct. Prezența PMN și a unor bacili scurți, gram negativi, colorați bipolar, capsulați dispuși în diplo în sensul lungimii sau în lanțuri scurte.

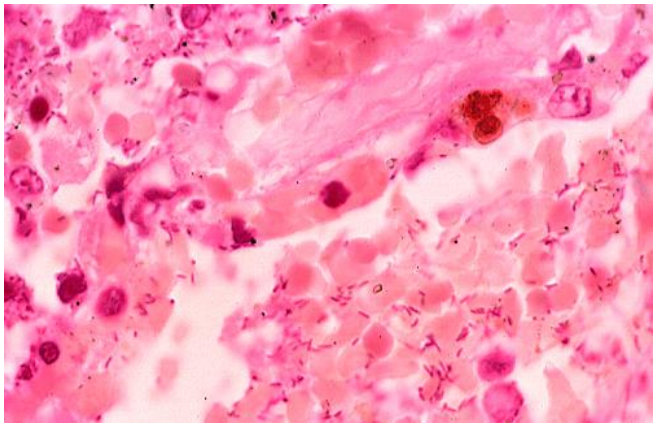


Figura 30. Frotiu – *Klebsiella pneumoniae*

Izolarea. Produsele normal sterile se însămânțează pe medii simple cum este geloza sânge.

Sângele pentru hemocultură se însămânțează în bulion (flacoane Bactec/ Bactalert), făcându-se repicări pe geloză sânge din flacoanele pozitive.

Materiile fecale se însămânțează pe medii selective pentru enterobacterii: MacConkey, ADCL (Leifson), XLD

Identificarea.

Caractere culturale. Pe geloză sânge dezvoltă colonii mari, alb-cenușii, mucoase (aspect de cultură ce curge pe suprafața mediului), colonii care, prin învechire, devin cafenii.

Pe mediul Istrati-Meitert se dezvoltă colonii mari, mucoide, inițial lactozo-pozitive (galbene), apoi, după 24 de ore, "lactozo-negative" (verzi), datorită fenomenul de "cameleonaj" prin alcalinizarea mediului.

Pe mediul Mac Conkey dezvoltă colonii mari, roșii, lactozo-pozitive, cu apariția fenomenului de "cameleonaj".

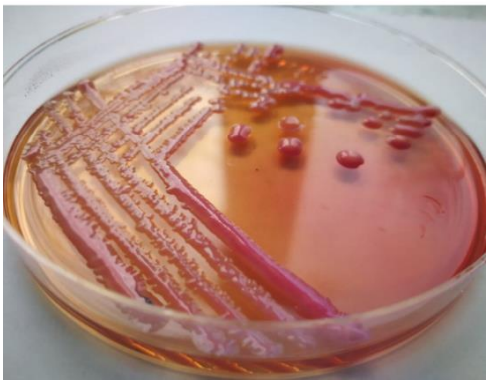
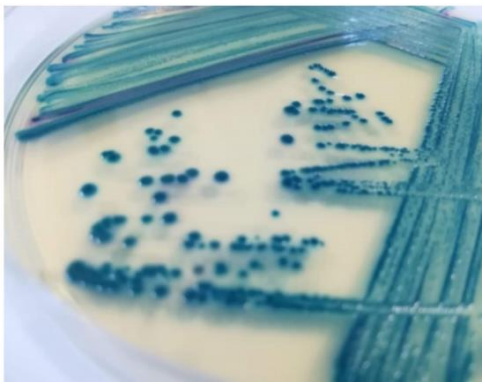
a)  b) 

Figura 31. *Klebsiella pneumoniae:* a) pe MacConkey și b) pe UTI

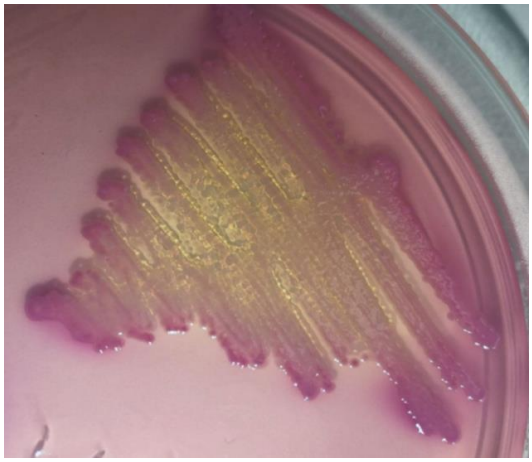


Figura 32. *Klebsiella spp.* – fenonemul de cameleonaj

Caracterele biochimice. Bacilii din genul *Klebsiella : G+*, *L+*, H2S -, imobili, ureaza +, indol-, etc.

Figura 33. Test API 10S

Sensibilitatea la antibiotice: antibiograma este obligatorie pentru orice tulpină izolată.

3.3. Genul *Proteus*

Genul *Proteus* cuprinde 8 specii, dintre care 3 se întâlnesc în patologia umană: *P. vulgaris*, *P. mirabilis* și *P. penneri*. Sunt bacili scurți, cu capetele rotunjite, gram negativi, cu polimorfism accentuat, foarte mobili (cili peritrichi), nesporulați, necapsulați, cu dispoziție necaracteristică, aerobi și facultativ anaerobi.

Semnificația clinică. La om și animale bacilul proteus face parte din microflora tubului digestiv. Sunt germeni condiționat patogeni, putând produce diferite infecții, în condițiile scăderii rezistenței organismului.

Recoltarea se face în raport cu localizarea infecției (urină, materii fecale, puroi, spută, LCR, sânge).

Examenul microscopic direct. Are valoare orientativă și se aplică doar produselor natural sterile (LCR, de pildă). Pe frotiuri colorate Gram, se evidențiază bacili gram negativi cu dispoziție necaracteristică.

Izolarea și identificarea. Produsele monomicrobiene se însămânțează pe medii simple, cum este geloza sânge, unde, bacilul proteus este ușor de recunoscut, prin **mirosul de putrefacție** degajat, precum si prin producerea **fenomenului de invazie**. El crește sub forma unor valuri concentrice care invadează toată placa. Dacă se repică pe geloză înclinată, mobilitatea apare sub forma **fenomenului de cățărare**.

Figura 34. *Proteus spp.* – pe geloză sânge – prezența fenomenului de invazie (valuri)

Produsele patologice, în care există și altă floră, se însămânțează, în mod obligatoriu, pe mediile selective, pentru a obliga bacilul proteus să crească sub forma unor colonii izolate și să nu invadeze ceilalți microbi, care astfel nu mai pot fi identificați.

Bacilul proteus crește sub forma unor **colonii** rotunde, de culoarea mediului, transparente la periferie și **negre la centru datorită H2S** pe care îl produce. Ele au fost comparate cu un **“ochi de pisică”.**

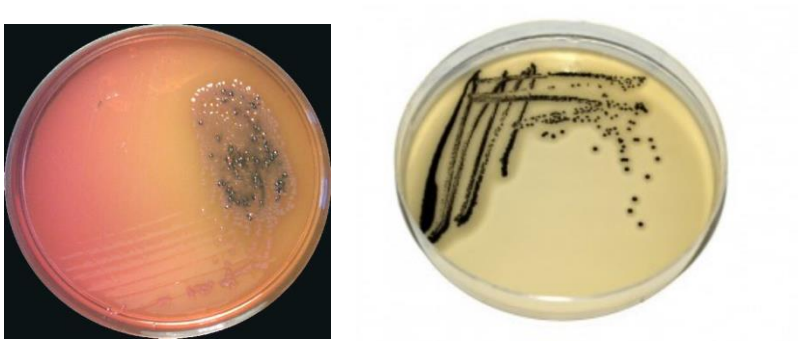


Figura 35. *Proteus spp.* – colonii negre datorită producerii de H2S

Testele biochimice definesc genul (G+, L-, H2S, Mobilitate +, Uree +, citrat+), dar diferențiază și speciile de *Proteus* între ele. Toate speciile de *Proteus* sunt mobile (fenomenul de cățărare, de invazie), produc urează și secretă fenilalanin- dezaminază (FAD).

Figura 36. Test API 10S

Sensibilitatea la antibiotice. Antibiograma este obligatorie pentru fiecare tulpină izolată, sunt natural rezistenți la colistin.

4. Diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de bacili Gram negativi non fermentativi şi bacteriile anaerobe

4.1. Diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de bacili Gram negativi non fermentativi

Pseudomonas aeruginosa, cel mai reprezentativ bacil Gram-negativ non fermentativ, cunoscut şi sub denumirea de bacil piocianic este răspândit în natură,

în ape de suprafaţă, pe vegetale şi în alimente. A fost izolat din mediul spitalicesc

în: apă distilată, soluţii saline, soluţii antiseptice şi dezinfectante, soluţii pentru irigaţii, soluţii perfuzabile, instalaţii şi obiecte sanitare, instrumentar medical.

Cel mai frecvent sunt implicaţi în producerea infecţiilor oportuniste sau nosocomiale, la pacienţi spitalizaţi sau cu imunodepresie, cu arsuri extinse, traumatisme ale pielii, catetere sau alte manevre medicale în zona aparatului genito-urinar, fibroză chistică.

Căile de transmitere sunt: mâinile murdare, aparatele de respiraţie artificială, fluidele intravenoase (infecţii nosocomiale).

Caracteristici morfologice: sunt bacili Gram negativi, subţiri, drepţi cu dispoziţie pleiomorfă, necapsulaţi, nesporulaţi, mobili datorită unui cil dispuns la unul dintre poli bacilului. Secretă pigmenţi difuzibili cu ar fi: piocianină (culo- are albastră), pioverdină (galben-verde), piorubină (culoare roşie), piomelanină (brun, brun-negru).

Diagnosticul de laborator

<u>Diagnostic bacteriologic</u>

- Recoltarea produselor patologice: puroi specific acestei etiologii (de culoare verde), urină, LCR, spută, soluţie antiseptică slabă, săpun
- Examenul microscopic: se realizează un frotiu colorat Gram pe care se evidenţiază bacili Gram negativi, subţiri.
- Însămânţarea pentru izolare pe geloză- sânge, mediul lactozat (cel mai utilizat- mediul Mac Conkey). De asemenea se pot utiliza şi medii lichide simple (bulion nutritiv).
- Identificarea se realizează pe baza:
  - Caracterelor culturale: pe geloză sânge dezvoltă colonii mari, hemolitice cu hemoliză de tip beta, tip S, rotunde, cu producerea de pigment- mediul devine verde sau albastru, cu reflexe metalice, care emană un miros aromat. Uneori coloniile pot fi mucoase, cu tendinţă de confluare (izolate de la pacienţii cu fibroză chistică). Pe mediul lichid formează o peliculă la suprafaţă. Pe mediul lactozat dezvoltă colonii lactozo-negative, aderente la mediu.

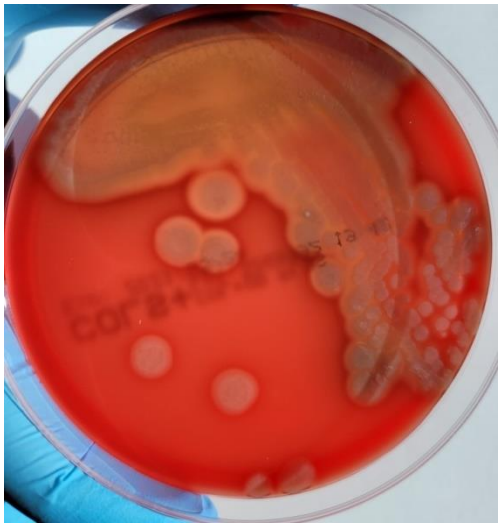


Figura 37. *Pseudomonas aeruginosa* – colonii pe geloză sânge

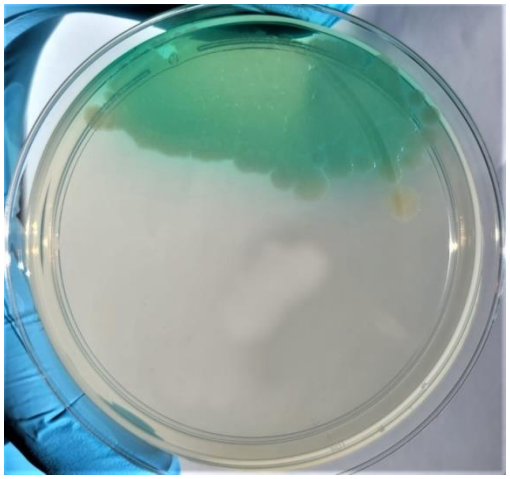


Figura 38. *Pseudomonas aeruginosa* – producerea pigmentului verzui

- Caractere morfo-tinctoriale: bacili Gram-negativi, subțiri, cu dispoziție pleiomorfă.
- Caractere biochimice: lactoză-negativă, produce citocrom oxidază și catalază, formează glucoză, reduce nitrații la nitriți, folosește citratul ca unică sursă de carbon.

Figura 39. Testul oxidazei - pozitiv

Identificarea se poate realiza pe teste API 20 NE sau API 10S. De asemenea este posibilă și identificarea automată pe sistem Vitek 2.

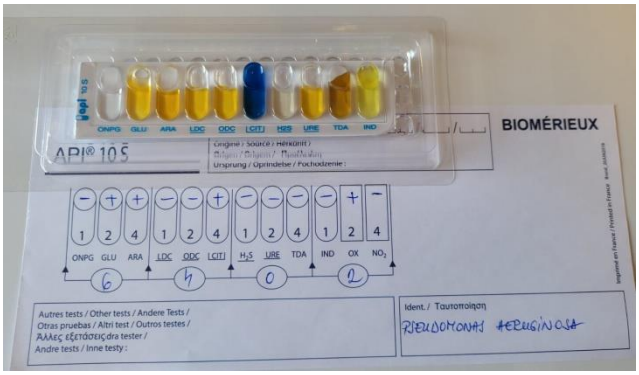


Figura 40. Test API 10S

- Testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase este obligatorie pentru că aceste bacterii dobândesc rezistență la o mare varietate de chimioterapice antiinfecțioase.

4.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de bacili Gram pozitivi anaerobi sporulați și alte bacterii anaerobe

Bacteriile strict anaerobe sunt microorganisme care nu se dezvoltă decât în absența oxigenului, prezența acestuia fiind foarte toxică culturii, chiar la o presiune de numai 10-5 atm. Aceste bacterii folosesc ca reacție energogenetică exclusiv fermentația, în condiții anaerobe, deci oxidația de substrat. Dacă fermentația se produce în prezența oxigenului, se formează radicali de superoxid (O_2) foarte toxici. Bacteriile strict anaerobe, spre deosebire de cele aerobe, sunt lipsite de superoxiddismutază (care transformă radicalul superoxid în apă oxigenată) și catalază (care descompune apa oxigenată - peroxidul de hidrogen=H_2O_2).

Bacteriile anaerobe sunt implicate în etiologia unor infecții umane severe dar, în același timp, sunt cele mai frecvente microorganisme care colonizează organismul uman, având un rol important în menținerea echilibrului ecologic al florei normale.

Numeroase specii bacteriene anaerobe fac parte din flora normală a tegumentului, mucoaselor tractului respirator superior, tractului gastro-intestinal și tractului uro-genital (mai frecvent colonizează uretra și vaginul).

Cunoașterea bacteriilor anaerobe ce colonizează diferite situsuri ale organismului este esențială, deoarece majoritatea infecțiilor anaerobe sunt endogene, cu bacterii ce fac parte din flora normală.

Există două grupe principale de germeni anaerobi:

1**. Germeni anaerobi exogeni, sporulați, toxigeni,** care aparțin genului *Clostridium* și au ca habitat natural solul dar pot fi întâlniți și în intestinul unor animale și chiar al omului, mai ales sub formă de spori și care în condiții favorabile au capacitatea de a germina.

Infecțiile exogene cauzate de germeni anaerobi includ infecții alimentare, gangrena gazoasă, fasceita necrozantă, celulita crepitantă, botulismul, tetanosul, gastroenterită și enterită necrotică (determinată de *Clostridium perfringens*).

2. **Germeni anaerobi endogeni, nesporulați, netoxigeni**. Anaerobii nesporulați domină speciile aerobe la nivelul căilor aeriene și digestive superioare, a colonului, vaginului și a unităților pilosebacee. Anaerobii nesporulați sunt atât coci cât și bacili, Gram pozitivi și Gram negativi:

- bacili Gram pozitivi nesporulați din genurile *Actinomyces, Bifidobacterium, Eubacterium, Propionibacterium, Lactobacillus*
- bacili Gram negativi nesporulați din genurile *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium,*
- coci Gram pozitivi nesporulați din genurile *Peptococcus, Peptostreptococcus*
- coci gram negativi nesporulați din genurile *Veillonella*

Astfel de anaerobi nesporulați sunt implicați în general în producerea infecțiilor de vecinătate (corelate cu localizarea acestora la nivelul diferitelor cavități ale organismului).

Diagnosticul infecțiilor produse de germenii anaerobi nu este ușor, presupune experiență și dotare corespunzătoare a laboratorului.

În acest capitol vom insista asupra selecției, recoltării și transportului produselor patologice, deoarece acestea sunt problemele cu care se confruntă medicul practician. Nerespectarea normelor de conduită în recoltarea produselor patologice, destinate cultivării anaerobe compromite, mai mult decât în orice infecție, șansele unui diagnostic etiologic.

Recoltarea. Germenii anaerobi pot iniția infecții cu localizări foarte variate. La recoltare trebuie evitată, în măsura posibilităților, contaminarea produsului cu flora anaerobă endogenă. În această categorie intră exudatul faringian, sputa expectorată, materiile fecale (cu excepția cazurilor când se urmărește izolarea *Cl. difficile, Cl. perfringens* sau *Cl. botulinum*), urina prin micțiune spontană sau cateterism, secreții vaginale și cervicale, secreții purulente de pe suprafața pielii. Cultivarea acestor produse va demonstra întotdeauna prezența germenilor anaerobi endogeni.

Transportul probelor. Oxigenul atmosferic este foarte toxic pentru bacteriile strict anaerobe, ceea ce impune obligativitatea însămânțării cât mai rapide a produsului biologic. În cazul în care se recoltează o cantitate redusă de produs, există posibilitatea ca germenii să fie distruși în contact cu aerul. De aceea se recomandă însămânțarea produsului în cel mult 10 minute. Dacă produsul este în cantitate mare, intervalul poate atinge o oră.

Pentru transport se utilizează, cu rezultate foarte bune, tuburi anaerobe care conțin mediu de transport (Cary - Blair modificat sau Stuart).

Examenul macroscopic direct al produselor patologice poate da informații cu privire la natura și calitatea produsului recoltat. Cele mai semnificative semne ale unei infecții cu germeni anaerobi sunt mirosul fetid, aspectul purulent, țesuturi necrozate, gaz în țesuturi, prezența de granule sulfurate.

Examenul microscopic direct pe preparatele colorate Gram este util în identificarea caracterelor morfologice și tinctoriale ale bacteriilor anaerobe din produsul patologic. Acest examen este esențial mai ales din punct de vedere clinic, întrucât majoritatea bacteriilor anaerobe necesită 48 de ore (sau mai mult) pentru creșterea pe mediile de cultură

Izolarea germenilor anaerobi. Pentru izolarea primară a bacteriilor anaerobe din produsele biologice pot fi utilizate medii neselective și selective. Mediile neselective cel mai frecvent utilizate sunt medii nutritive pe bază de agar-sânge, suplimentate cu vitamina K1 și hemină. Mediile selective asigură izolarea tuturor germenilor anaerobi cu importanță în patologia umană.

Izolarea germenilor are loc în anaerobioză strictă, realizată cu ajutorul Genbag anaerobic (pungă cu reactiv care elimină oxigenul).

Mediile neselective însămânțate vor fi incubate în anaerobioză pentru o perioadă de cel puțin 48 de ore înainte de expunerea la oxigen (se protejează astfel bacteriile aflate în faza logaritmică de creștere, de acțiunea toxică a oxigenului).

Identificarea. Infecțiile cu germeni anaerobi sunt, în general, polimicrobiene, izolarea diverselor specii fiind dificilă și de durată. Pentru identificare sunt utilizate caracterele culturale, morfotinctoriale, metabolice, precum și testele de patogenitate. Orice tulpină anaerobă izolată din produse normal sterile trebuie identificată. Identificarea anaerobilor, la nivel de specie, se face pe baza proprietăților biochimice.

Antibiograma. Pentru testarea sensibilității la antibiotice se recomandă folosirea **testelor E**.

4.2.1. Bacili gram pozitivi anaerobi sporulați

Genul Clostridium

Bacteriile din genul *Clostridium* sunt bacili Gram pozitivi, sporulați având spori ovali sau sferici, terminali sau subterminali, care deformează bacteria; sunt anaerobi stricți, mobili sau imobili.

Bacteriile strict anaerobe sunt bacterii sensibile la acțiunea oxigenului, acesta fiind toxic pentru ele. În genul *Clostridium* sunt clasificate specii patogene care sintetizează exotoxine care reprezintă principalii factori de patogenitate:

A) Clostridium tetani

Este un bacil Gram pozitiv, sporulat, cu sporul dispus terminal, ceea ce-i conferă un aspect de băț de chibrit. Există mai multe tipuri antigenice, însă toate sintetizează același tip de toxină. Acțiunea toxinei tetanice se manifestă la nivelul sistemului nervos central, unde blochează sinapsele inhibitorii și determină contractura musculară (tetanosul complet).

Profilaxia tetanosului se face prin vaccinare cu anatoxină tetanică (trivaccinul DTP sau divaccinul DT, intră în schema de vaccinări obligatorii). În prezența plăgilor cu potențial tetanigen se procedează la toaleta chirurgicală și la rapel cu ATPA (anatoxina tetanică purificată și adsorbită).

Pentru diagnosticul de laborator se recoltează puroi din plagă, care se însămânțează pe medii pentru anaerobi (agar sânge). Frotiul colorat Gram evidențiază bacili Gram pozitivi cu sporul dispus terminal. Formează colonii gălbui-cenușii care au tendința de confluare dacă concentrația de agar a mediu- lui este mai mică de 4%. În mediile lichide formează sediment (datorat sporilor), iar culturile degajă un miros caracteristic de corn ars. Este hemolitic și slab proteolitic și zaharolitic.

Antibiograma, efectuată prin metoda difuzimetrică în dublu strat de agar, finalizează diagnosticul.

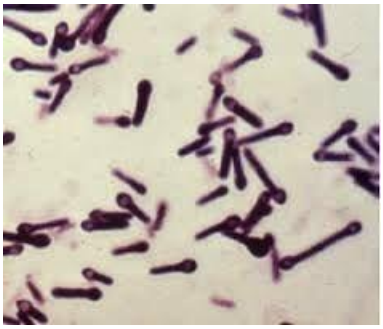


Figura 41. Frotiu - *Clostridium tetani*

B) Clostridium botulinum

Este un bacii Gram pozitiv mobil datorită cililor peritrichi, cu sporul dispus subterminal.

Este o bacterie răspândită în solul tuturor regiunilor geografice. Are mai multe tipuri antigenice, fiecare dintre tipurile antigenice sintetizând și eliberând o toxină proprie. Tipurile antigenice A, B, E și F produc botulismul la om. Toxina botulinică are neurotropism, iar mecanismul său de acțiune constă în blocarea transmiterii nervoase, prin inhibarea secreției de acetilcolină.

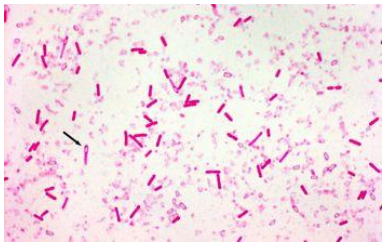


Figura 42. Frotiu - *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum se prezintă ca și bacili Gram pozitivi cu spori dispuși subterminal.

Pe mediile solide (pentru anaerobi) formează colonii neregulate cu suprafața granulară și cu o margine în extensie continuă. Exercită hemoliză pe

mediile cu sânge. De regulă, însă diagnosticul intoxicației botulinice se face prin evidențierea toxinei și determinarea tipului acesteia. Toxina se caută în lichidul de spălătură gastrică sau de vărsătură în conținutul intestinal sau în lichidul din conserva incriminată. Pentru aceasta se procedează la o reacție de neutralizare *in vivo*, prin inocularea la șoareci de laborator. Se folosește 10 șoareci, din care 2 rămân ca și martori și nu se protejează cu ser antibotulinic. Ceilalți vor forma 4 perechi, fiecare dintre aceste perechi urmând a se proteja cu un alt ser anti- botulinic specific de tip (A, B, E și F). Fiecare animal se inoculează cu filtratul alimentului incriminat. Animalele protejate prin serul antibotulinic specific de tip antigenic supraviețuiesc, în timp ce celelalte animale, inclusiv martorii, mor. Dacă mor toate animalele se poate exclude botulismul.

C) Clostridiile gangrenei gazoase

Gangrena gazoasă apare ca o complicație a plăgilor contaminate cu pământ unde se realizează condiții de anaerobioză necesare germinării sporilor și se caracterizează prin necroza și putrefacția țesuturilor afectate, la aceste semne locale adăugându-se și semne generale. Infecția este, de fapt, polimicrobiană, la producerea ei participând specii anaerobe, aerob-anaerob facultative și chiar aerobe.

Diagnosticul de laborator este numai bacteriologic și de urgență.

Recoltarea interesează exudatele din plagă, fragmente de țesuturi necrozate, sânge, puroi.

Examenul microscopic direct din produsul patologic are o mare valoare diagnostică. Pe frotiul colorat Gram se remarcă un polimorfism bacterian accentuat, evidențiindu-se bacili mari Gram pozitivi, izolați, în perechi sau lanțuri scurte, cu spor central, subterminal sau fără spori (*Clostridium perfringens* sporulează numai în culturi vechi), unii dintre ei capsulați (*Clostridium perfringens).*

Izolarea se face pe medii pentru anaerobi și este necesar ca fiecare specie să fie izolată în cultură pură pentru a se putea trece la etapa următoare. Pentru izolare se folosesc medii pentru anaerobi (Nagler, Willis-Hobbs).

Identificarea necesită parcurgerea tuturor etapelor (pe geloză glucozată cu gălbenuș de ou - mediul Nagler, *Clostridium perfringens* produce reacția Nagler, datorită alfa toxinei, o lecitinază, care difuzează în jurul coloniilor și descompune lecitino-vitelina din ou producând un precipitat care opacifică mediul).

Antibiograma se execută prin tehnica difuzimetrică în condiții de anaerobioză (în dublu strat).

Tratamentul gangrenei gazoase trebuie instituit de urgență și constă în administrarea de ser antigangrenos polivalent, antibiotice și desigur, îngrijirea chirurgicală a plăgii (eliminarea țesuturilor necrozate, drenarea colecțiilor închise).

4.2.2. Germeni anaerobi endogeni, nesporulați

Aceștia reprezintă un al doilea grup de microorganisme, anaerobe, patogene pentru om. Ele cuprind un ansamblu de bacterii foarte diferite din punct de vedere morfologic și funcțional, dar care au ca trăsături comune anaerobioza, comensalismul cutaneomucos și potențialul patogen.

Frecvența infecțiilor cu germeni anaerobi nesporulați este în continuă creștere, acestea fiind prin excelență bacterii “oportuniste”. Cel mai frecvent dau infecții în asociație cu alte specii microbiene.

Nu vom insista asupra diagnosticului de laborator, care urmează principiile generale de izolare și identificare a germenilor anaerobi, dar vom prezenta în linii generale taxonomia acestor germeni, care a suferit mari modificări în ultimul deceniu și semnificația lor clinică.

A. Bacili gram negativi anaeorbi

Bacilii gram negativi strict anaerobi sunt cuprinși în familia *Bacteroidaceae*. Ei fac parte din flora comensală a mucoasei respiratorii, a tractului digestiv și a tractului genital. Din cele 20 de genuri, importante în patologia umană sunt genurile *Bacteroides*, *Prevotella*, *Prophyromonas* și *Fusobacterium*.

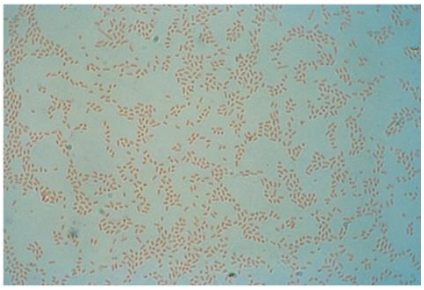


Figura 43. Frotiu - *Bacteroides*

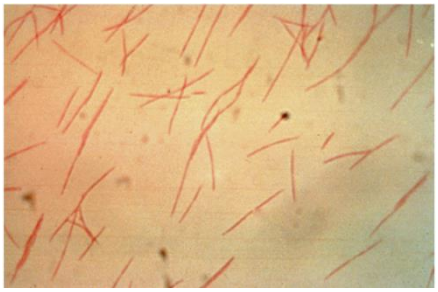


Figura 44. Frotiu – *Fusobacterium*

Diagnosticul infecţiilor produse de bacilii gram negativi anaerobi constă în izolarea şi identificarea lor din produsele biologice. Întrucât fac parte din flora normală a organismului, produsele contaminate cu această floră nu pot fi prelucrate. Diagnosticul este foarte laborios şi implicaţia lor etiologică trebuie corelată cu realităţile clinice. Izolarea lor din produse normal sterile are întotdeauna semnificaţie patologică.

B. Bacili gram pozitivi anaerobi

Propionibacterium acnes este agentul etiologic al acneei juvenile în asociaţie cu alte microorganisme. Are o morfologie similară corynebacteriilor.

Actinomicetele sunt bacili gram pozitivi anaerobi, nesporulaţi care cresc sub formă de filamente. Ele fac parte din flora normală a cavităţii bucale de unde pot iniţia, în anumite condiţii infecţii endogene. Specia cel mai frecvent întâlnită în patologia umană este *Actinomyces israelii*, în asociaţie cu alte microorganisme anaerobe ale cavităţii bucale (*Bacteroides* spp). Dintre infecţii menţionăm actinomicoza cervicofacială, toracală, abdominală, parodontită etc.

Diagnosticul este bacteriologic. Examenul microscopic direct al puroiului recoltat din abcese este de mare valoare, deoarece morfologia filamentoasă, ramificată a actinomicetelor este caracteristică. Din puroiul recoltat, care este grunjos se zdrobesc 2-3 grunji (formaţi prin agregarea filamentelor germenilor ramificaţi)

între 2 lame. Lamele se despart, și fiecare se colorează Gram. Cultivarea se face pe medii complexe în condiții de anaerobioză și durează mult.

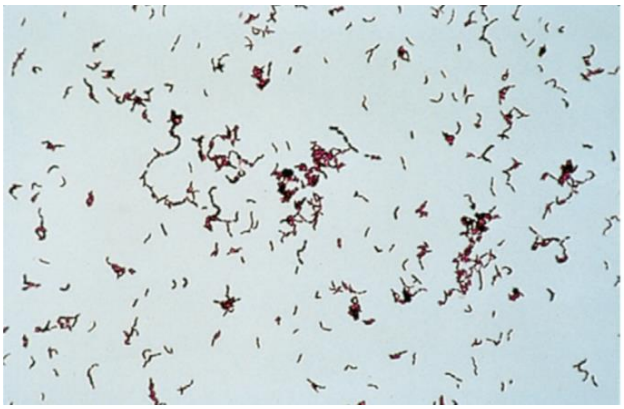


Figura 45. Frotiu - *Propionibacterium acnes*

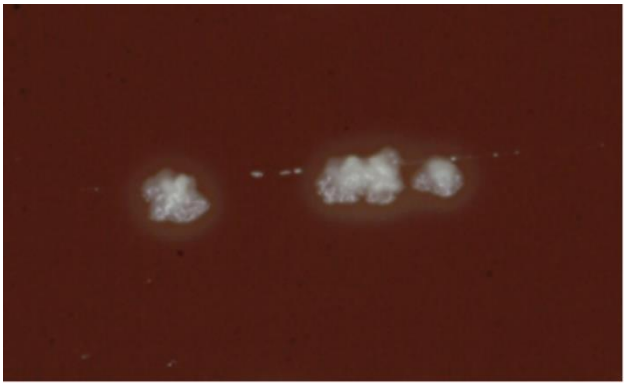


Figura 46. *Actinomyces israelii colonii*

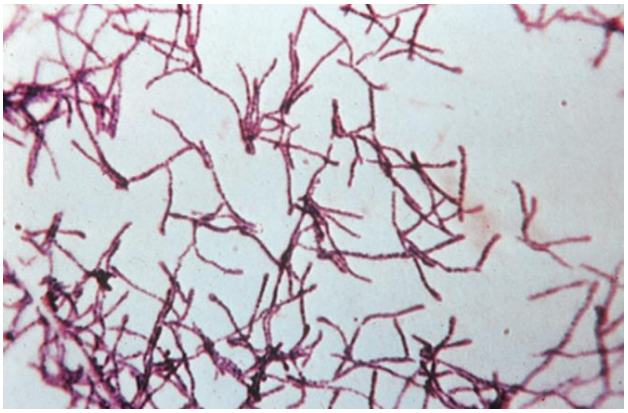


Figura 47. Frotiu - *Actynomices israelii*

C. Cocii gram pozitivi anaerobi

Cocii gram pozitivi strict anaerobi sunt cuprinși în genurile *Peptococcus* și *Peptostreptococcus*. Ei fac parte din flora normală a cavității orale și produc infecții numai în asociere cu alți anaerobi. Pătrund prin soluții de continuitate ale pielii în profunzime, unde produc împreună cu alte specii, infecții purulente subacute de tipul abceselor cerebrale, otitelor, sinuzitelor. Pot participa de asemenea în infecții ale tractului respirator inferior și ale regiunii abdominale (peritonită, apendicită, abces hepatic).

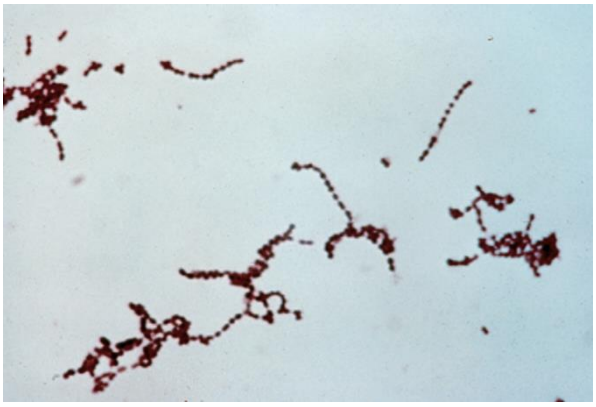


Figura 48. Frotiu - *Peptostreptococcus*

Ca și în cazul celorlalți germeni anaerobi endogeni nesporulați, diagnosticul este dificil și de durată.

D. Cocii gram negativi anaerobi

Sunt reprezentați de genul *Veillonella* care face parte din flora normală a cavității orale. Poate produce pioree alveolara.

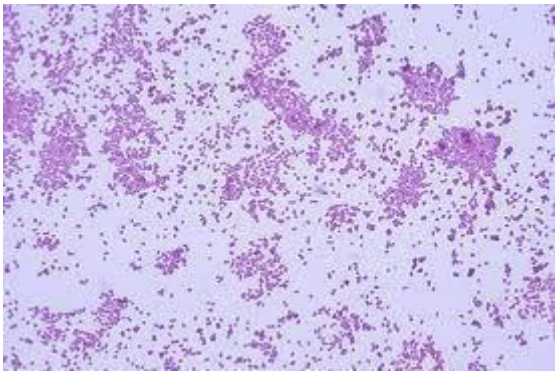


Figura 49. Frotiu - *Veillonella*

5. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Treponema, Mycobacterium*

5.1. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Treponema*

Treponema pallidum agentul etiologic al sifilisului este descris în 1905 de către profesorul de zoologie Schaudin și medicul dermatolog Hoffman. Treponemele (din limba greacă Trepo = a învârti, Nema = fir) sunt bacteria strict anaerobe sau microaerofile.

- Deși sunt cunoscute gram negative, nu se colorează Gram, ci sunt utilizate colorații speciale.
- Sunt foarte pretențioase nutritiv, treponemele patogene neputând fi cultivate pe medii de cultură.
- Sunt menținute în viață prin inoculare la animale susceptibile.(intra-testicular la iepure care va dezvolta orhită sifilitică)
- În acest fel s-a reușit păstrarea în viață a unei tulpini de referință de *T. pallidum,* izolată de la un pacient decedat de neurosifilis în 1912, numită tulpina Nichols.
- Această tulpină este folosită la prepararea antigenelor de *T. pallidum* necesare diagnosticului serologic.

T. pallidum are 3 tipuri de antigene:

- O haptenă lipidică, comună treponemelor nepatogene și țesuturilor animale (cardiolipin). Acest antigen determină în organism formarea de anticorpi antilipoidici (Wassermann).
- Antigenul proteic Reiter, cu specificitate de gen *Treponema*. El determină apariția de anticorpi antiproteici evidențiabili prin reacția de fixare a complementului.
- Antigene specifice, numai pentru treponemele patogene.

Anticorpii ce se formează în organism față de aceste antigene, cum sunt anticorpii antiproteici, antipolizaharidici și imobilizinele se evidențiază prin mai multe reacții serologice, strict specifice pentru *Treponema pallidum*. Căile de transmitere a agentului etiologic:

- sexuală (șancrul sifilitic genital și anal reprezintă 99% din cazurile de sifilis primar)
- transplacentară de la mamă la făt (transmitere verticală)
- iatrogentă (transfuzii)
- supraviețuirea la 4ºC timp de 24 de ore a *Treponemei pallidum* în sânge explică transmiterea posttransfuzională

METODE DE DIAGNOSTIC

Punerea în evidență a *Treponemei pallidum* prin examen direct (diagnostic bacteriologic). În funcție de stadiul evolutiv al bolii se recoltează:

- ✓ în sifilisul primar: exudat din șancru, aspirat ganglionar, biopsii
- ✓ în sifilisul secundar: exudat din leziuni, biopsii
- ✓ în sifilisul terțiar: LCR, piese bioptice sau necroptice
- ✓ în sifilisul congenital precoce: prelevate din cordon ombilical, placentă, secreții nazale, leziuni cutanate

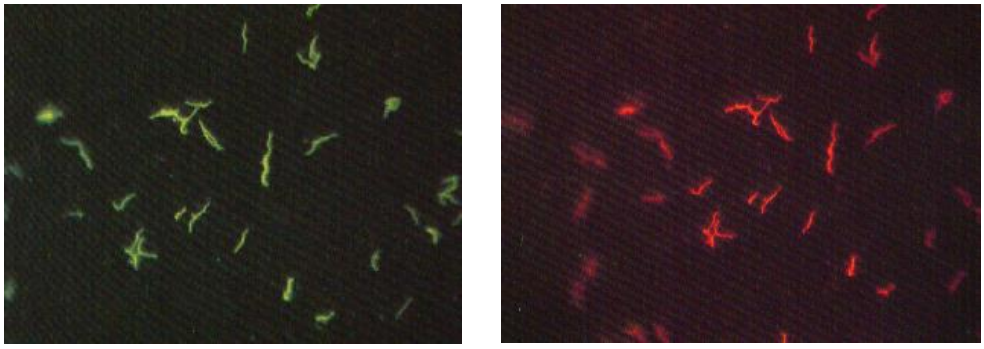
Evidențierea microscopică a treponemelor

1. <u>Microscopia pe fond întunecat</u>
   - ➢ Avantaje: rapiditate
   - ➢ Dezavantaje:
     - Prelucrarea imediată a probelor
     - Diferențierea de spirochetele comensale
     - Experiență
     - Sensibilitate mică (50-80%)

2. <u>Imunofluorescenţă cu Ig marcate cu fluoresceină</u>
   - ➢ Avantaje:
     - Sensibilitate și specificitate mare
     - Diferențierea de treponemele comensale
   - ➢ Dezavantaje:
     - Echipament special și consumabile scumpe
     - Experiență
     - Nu diferențiază treponemele vii de cele moarte

Preparate fixate și colorate

- ➢ Cu tuș de India
- ➢ Giemsa
- ➢ Impregnare argentică
  - Fontana Tribondeau (frotiuri)
  - Levaditi (țesuturi)



a) Izotiocianat de fluoresceină b) Rodamină

Figura 50. Imunoflorescență cu anticorpi monoclonali marcați cu a) izotiocianat de fluoresceină și b) rodamină.

Figura 51. *Treponema pallidum* - Microscopie cu fond întunecat

Diagnosticul serologic constă în evidențierea Ac în sânge și LCR. Se realizează prin teste nespecifice și teste specifice.

TESTE NESPECIFICE:

- RFC
- VDRL
- RPR

VDRL - Test screening ce are la bază o reacție de floculare care utilizează antigenul cardiolipinic.

- Avantaje:
  - se execută prin tehnici ușor reproductibile,
  - mare sensibilitate
- Dezavantaje:
  - lipsa de specificitate, dând cel mai mare procent de rezultate biologic fals pozitive, la persoane care nu aveau sifilis,

RPR - O reacție de floculare ca și VDRL care utilizează antigen cardiolopinic la care s-au adăugat particule fine de cărbune

- Avantaje:
  - Se poate utiliza plasma ca atare sau ser neinactivat
  - Se poate citi cu ochiul liber
- Dezavantaje
  - Nu poate fi folosită pentru LCR

ART (test RPR AUTOMAT) Se practică pe scară largă din 1968

TRUST (test RPR) care utilizează în loc de particule de cărbune, roșu de toluidină.

USR (unheated serum reagin)- Cu același principiu ca și RPR dar citirea se face la microscop

RFC cu antigen Wassermann (1906) care astăzi nu mai este utilizat.

REACȚIA BORDET- WASSERMANN

Utilizează ca antigen un extract de ficat de fetus cu sifilis congenital.

- Avantaje: specificitate mai mare decât la reacțiile de floculare
- Dezavantaje: sensibilitate mai mică, tehnică laborioasă

TESTE SPECIFICE

- Se utilizează pentru confirmarea testelor standard nespecifice
- Pentru diagnosticul sifilisului latent și tardiv

Teste cu specificitate de grup treponemic

- RFC cu extract din tulpina Reiter (Treponema phagedenis)
- Sensibilitate și specificitate mai mică decât a testelor specifice

Teste specifice treponemelor patogene

✓ *Teste de imobilizare a treponemelor (NELSON)* care utilizează treponeme vii tulpina Nichols.

Cu toate că este cel mai specific test, se efectuează rar astăzi, deoarece este nevoie de treponeme vii și de iepuri infectați și tehnica este dificilă.

Dacă se imobilizează peste 50% din treponeme reacția este pozitivă, iar dacă imobilizarea este sub 20% reacția este negativă.

✓ *Teste specifice cu treponeme inactive- TP-PA* (*Treponema pallidum* particle agglutination)

Teste de aglutinare corpusculară a *Treponemei pallidum*: reacție de aglutinare pasivă care utilizează suspensie de treponeme inactivate cu formol și puse în contact cu ser de pacient.

✓ *Test cu treponeme inactivate FTA-ABS*

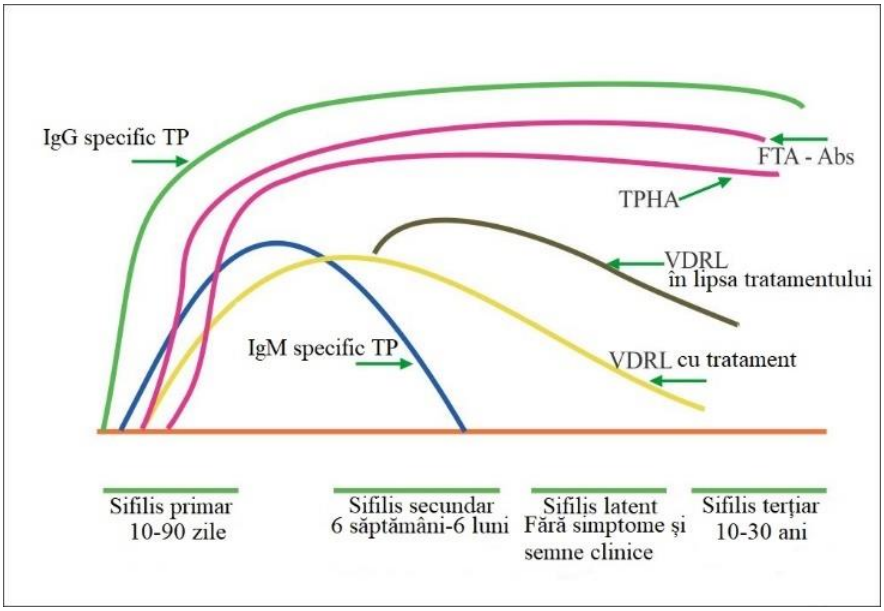


Figura 52. Serologie sifilis

Test de referință standard, care este o imunofluorescenţă indirectă. Se folosește tulpina Reiter pentru a fixa anticorpii nespecfici, comuni, determinați de treponeme atât patogene, cât și comensale.

Pe lame sunt depuse tulpini de *Treponema Nichols/pallidum,* pe care se fixează anticorpii specifici, rămași în serul sau plasma de bolnav, după îndepărtarea celor nespecifici, formând complexe antigen- anticorp. Se adaugă conjugat fluorescent anti-Ig umane. La examinarea la microscopul cu fluorescență, treponemele din complexele marcate fluorescent, apar galben-verzui.

- Avantaje:
  - Specificitate și sensibilitate foarte mare
  - Valabil și pentru LCR
  - Este primul test serologic care se pozitivează
  - Se aplică și în diagnosticul sifilisului congenital dar utilizează antiimunoglobulină umană de tip IgM
- Dezavantaje:
  - Foarte costisitor

✓ *Test cu extract treponemic - TPHA are* la bază reacția de hemaglutinare care utilizează pentru evidențierea macroscopică a reacției hematii de berbec îmbrăcate cu extract de *Treponema pallidum* care se pun în contact cu ser de pacient. Aglutinarea reacție pozitivă, iar depunerea în buton reacție negativă.

- Avantaje:
    - Poate fi aplicată și LCR
    - Disponibilitatea kiturilor
    - Nu necesită echipament special
    - Ușor de efectuat
    - La fel de sensibilă ca FTA-ABS în stadiile tardive ale sifilis
- Dezavantaje:
    - Mai puțin sensibil decât FTA-ABS în sifilisul primar
    - *Test cu extract treponemic-EIA*

Reacție imunoenzimatică, utilizată ca test screening în laborator cu o dotare corespunzătoare, dar și în determinarea Ac de tip IgG și IgM anti-treponemici în sifilisul congenital

INNO-LIA SYPHILIS

Test relativ nou de confirmare a AC anti-treponemici. Folosește un polipeptid sintetic și recombinat din proteine extrase din *Treponema pallidum* pentru determinarea Ac intratecali. Se utilizează pentru diagnosticul neurosifilis latent.

Figura 53. Kit Inno-Lia Syphilis

CONCLUZII

- Diagnosticul de laborator al sifilisului presupune teste standard cu specificitate mai mică dar sensibilitate mai mare, și care sunt primele necesare atât în diagnosticul cazurilor izolate cât și în screening. (VDRL)

- Cazurile pozitive pentru testele standard cu specificitate redusă trebuie confirmate cu testul FTA-ABS sau TPHA
- Pentru diagnosticul neurosifilisului latent se recomandă testul INNO-LIA. Acest test are o specificitate și sensibilitate net superioară celorlalte teste specifice

Algoritmul de diagnostic se va schimba curând testele nespecifice fiind înlocuite cu screening imunoenzimatic de tip EIA și INNO-LIA, fapt ce va scurta timpul de diagnostic și va îmbunătății calitativ rezultatele.

5.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni din genurile *Mycobacterium*

Mycobacterim tuberculosis (bacilul Koch) este agentul etiologic al tuberculozei, care este o boală infecțioasă. Transmiterea infecției se realizează cel mai frecvent pe cale aeriană, dar și pe cale digestivă, cutanată. Suspiciunea de infecție este clinică și radiologică iar confirmarea este bacteriologică.

Timpul de diagnostic

Test	**Limite de timp acceptabile**
Examenul microscopic pentru evidențierea BAAR	24 de ore
Cultura în mediul LJ	3-8 săptămâni
Cultura în mediul lichid	1-3 săptămâni (6 săptămâni pentru rezultatele negative)
Identificarea culturii pozitive	Imediat după pozitivare
ABG mediul lichid	14 zile de la data culturii pozitive
ABG linia întâi, mediul solid	30 zile de la data culturii pozitive
ABG linia a doua	4 săptămâni de la data culturii pozitive
Testele de biologie moleculară pentru diagnostic	24-48 ore

Recoltarea produselor patologice

- Sputa se recoltează dimineața, sub supravegherea personalului instruit, 2 eșantioane, la cel puțin 8 ore interval între două eșantioane. Cantitate 3-5 ml.
- Aspirat bronșic: cantitate 10-15 ml
- Aspirat gastric – se recoltează la bolnavi care nu expectorează, copii, adulți >60 ani. Dezavantaj: trebuie prelucrat imediat

- Fluide ale corpului: pleural, peritoneal, pericardic, colecții închise, LCR. Cantitate minim 2 ml - 50 ml. Sunt produse patologice paucibacilare
- Urina – se recoltează eșantioane multiple (3-4). Este precedat de urocultură pentru non-Tb. Cantitatea este de 10-50 ml
- Piese de biopsie, puroi din fistulă, sânge se recoltează pe sisteme speciale de colectare, fără conservanți. Pentru puroi nu se acceptă recoltare pe tampon faringian, totuși, acceptat pe mediul Amies
- Materiile fecale necesită prelucrare imediată. Cantitatea recoltată necesară este de 5-10 ml. Limite: erori la microscopie, culturi contaminate

Examenul microscopic

• 1882: Robert Koch descoperă bacilul tuberculozei

• 1883: Ziehl și Nielsen -metoda de colorare cu fuxină la cald

Conținutul bogat în acizi micolici din structura peretelui micobacteriilor face ca ele să fixeze la cald compușii de anilină (fuxină), sau substanțe fluorescente- fără încălzire (auramina, auramina - rhodamina) coloranții respectivi rezistând la decolorarea cu alcool acidulat, de aici și denumirea de bacili acido-alcoolo-rezistenți (BAAR).

Pentru ușurarea examinării este necesară colorarea fondului preparatului (albastru de metilen).

În cazul colorației fluorescente-necesară cuparea fluorescenței preparatului (cu albastru de metilen sau permanganat de potasiu).

Microscopia cu LED UV (light-emitting diodes) a fost recomandata de OMS în 2009. Permite citirea unui număr mai mare de frotiuri (peste 35/zi).

COLORAȚIA ZIEHL NIELSEN

1. Se pun lamele cu frotiurile fixate pe suportul de colorare -să nu se atingă !
2. Se acoperă complet frotiurile cu soluție 0.3% de fuxină fenicată
3. Se trece pe sub frotiuri flacăra unui bec de gaz până la emiterea de vapori, fără să fiarbă colorantul. Se repetă acțiunea de 3-4 ori în primele 3 minute. Se completează cu fuxină. Se lasă până la 10 minute.
4. Se spală cu jet slab de apă de robinet și scurge apa.
5. Se acoperă frotiul cu alcool-acidulat 3% și lasă-l pentru decolorare maxim 3 min. Se repetă decolorarea dacă frotiul rămâne roșu.
6. Se spală din nou cu jet slab de apă de robinet și se scurge apa.
7. Se acoperă frotiul cu albastru de metilen 0,3% timp de 30 sec- max 1 min
8. Se spală blând sub jet de apă de robinet și scurge apa.
9. Se șterge colorantul de pe dosul lamei cu șervet îmbibat în alcool medicinal.
10. Se usucă frotiurile în poziție înclinată în suport de lame la temperatura camerei. Nu încălzi lamele pentru grăbirea uscării!

Se examinează la microscop optic: ocular 10x, obiectiv cu imersie 100x (mărire 1000x), după uscare completă.

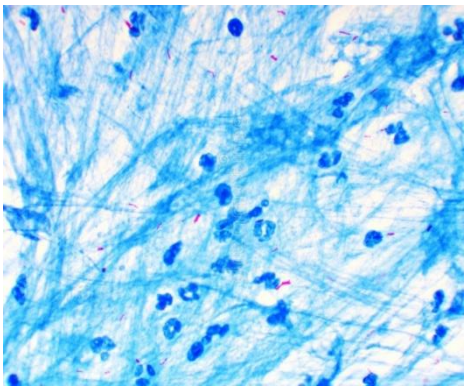


Figura 54. Bacilul Koch – colorația Ziehl – Nielsen

Cultivarea:

1932: Lowenstein Jensen- mediul solid pe baza de ou
1977: Middlebrook si col: sistem radiometric (BACTEC 460)
- sistem colorimetric (Bact-Alert/MB-BacT)
- sistem fluorimetric (Bactec MGIT 960)
- sistem bazat pe gazometrie (VersaTrek)

Figura 55. Sistem fluorimetic Bactec MGIT 960

Citirea culturilor se face diferit:

- Mediul Lowenstein Jensen (LJ) se face manual la 21, 30, 45, 60 zile. Dacă volumul de lucru permite, se poate citi săptămânal.
- Mediul lichid se face automat, indiferent de sistemul de cultivare, cu raportare pozitiv (la 1-42 zile) sau negativ (la 42 zile).

Rezultatele culturilor pe mediul LJ se exprimă semicantitativ iar cele ale culturilor în mediul lichid, calitativ: pozitiv/negativ.

Identificarea:

Examen morfologic macroscopic al culturilor pe mediul LJ

- *M.tuberculosis* – colonii R (Rough) colorate crem-gălbui
- *M.bovis/M. canetti* – colonii S (Smooth) alb-gălbui
- NTM – colonii S sau R, albe, gălbui, portocalii, gri, roz.

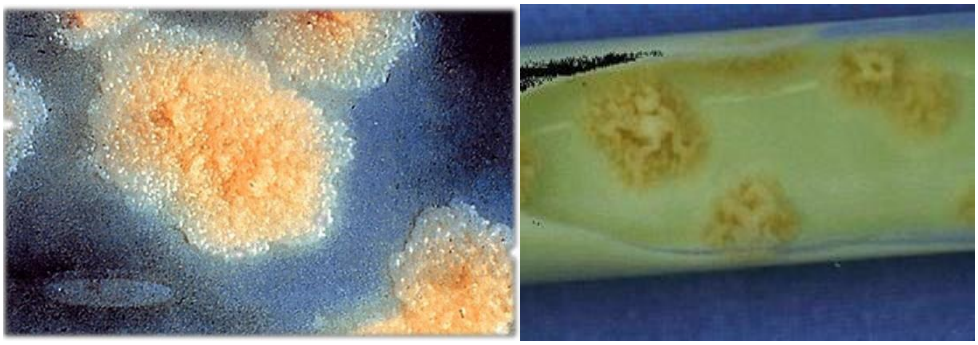


Figura 56. Colonii de *M. tuberculosis*

Figura 57. Colonii de *M. bovis*

Examen morfologic macroscopic al culturilor pe mediul lichid Middlebrook

- Grunji resuspendați prin agitare ușoară- MTB, streptococi, uneori fungi
- Tulbure uniform- NTM, coci, bacili, uneori fungi

Frotiurile din culturi se colorează exclusiv ZN (se colorează și microbii de contaminare). Culturile pentru care frotiul indică prezența BAAR se testează obligatoriu pentru confirmarea apartenenței la complexul *M. tuberculosis*. Se folosește test rapid imunocromatografic Ag MPT64.Culturile cu rezultat negativ Ag MPT64 se trimit pentru identificare de specie.

Antibiograma (ABG) este necesară pentru confirmarea/excluderea rezistenței.

- ABG linia 1 - pentru toate cazurile TB cu > de 10 colonii în cultura primară
- ABG linia 2 - pentru toate cazurile MDR > de 10 colonii în cultura primară

ABG]n mediu lichid in sisteme automate este standardul de aur recomandat pentru ABG L 2 în acest moment.

Metode de biologie moleculară:

- LPA: hibridizare liniară- GenoType (HAIN-MTBDRplus, HAIN-MTBDRsl)
- RT-PCR: amplificare AND (PCR, PCR in timp real) – GeneXpert

Aceste teste reduc timpul de confirmare a TB sau/și a TB MDR la 24-48, respectiv 2 ore.

Complexul *M tuberculosis* – pozitiv NTM- negativ

Figura 58. Teste identificare Complex *Mycobacterium tuberculosis*

6. Diagnosticul de laborator al infecțiilor fungice

Fungii sunt organisme eucariote, microscopice, uni sau pluricelulare. În micologia medicală cel mai utilizat criteriu de clasificare a fungilor este cel morfologic. Din aceste punct de vedere avem:

- Fungi filamentoși sunt microorganisme pluricelulare care prezintă filamente tubulare septate sau neseptate denumite hife. Ansamblul de hife este denumit miceliu care este vizibil macroscopic sub forma unor colonii.
- Levuri care sunt microorganisme unicelulare, cu formă ovalară sau rotundă, ce se multiplică în principal prin blastospor (blastoconidie), care se poate desprinde de celula mamă printr-un proces de fuziune, fie rămâne atașat de aceasta si generează succesiv noi indivizi, sub forma unor agregate liniare denumite pseudohife
- Fungi dimorfici, care prezintă o dualitate morfologică în funcție de condițiile de dezvoltare. Ei pot să fie levuri în țesuturile organismelor parazitate sau la 37ºC *in vitro* pe mediile speciale și sub formă de filamente când sunt cultivați la temperatura camerei sau la 30ºC, pe mediile uzuale.

Diagnosticul de laborator parcurge următoarele etape: de la prelevarea și transportul probelor, examen microscopic direct sau în funcție de caz examen histopatologic, cultivarea în vederea izolării agentului etiologic, identificarea până la nivel de specie și în final testarea sensibilității la substanțele antifungice.

Recoltarea să fie realizată de către personal medical instruit în acest scop. Cantitatea de prelevat trebuie să fie suficient de mare pentru a permite efectuarea examenului microscopic direct, cultivarea și eventual examenul histopatologic. Prelucrarea probelor va începe cât mai curând posibil după recoltare, fără a depăși timpul maxim de așteptare (2 ore la temperatura camerei).

Produsele patologice de la nivelul mucoasei orale se recoltează cu un tampon steril, prin trecerea repetată a acestuia de cel puțin 10 ori, peste zonele cu leziuni. În cazul leziunilor ulcerate sau pseudo-membranoase, se poate recurge la raclarea ușoară a acestora cu ajutorul unei chiurete sterile sau a unei lame de sticlă pentru microscopie. În cazul aparatelor protetice, prelevarea probelor se realizează de pe fața mucozală a acestora, zonă predilectă a acestora pentru apariția biofilmelor levurice. Din pungile parodontale, prelevarea probelor se realizează cu sonda parodontală, în zonele vestibulară, orală, vestibulo-distală, vestibulo-mezială, oro-distală și oro-mezială. În endodontite prelevarea probelor se realizează cu ajutorul conurilor de hârtie sterile, de dimensiuni diferite în funcție de dimensiunea canalelor radiculare.

Conurile de hârtie și produsul patologic din pungile parodontale să se trimită în laborator, pentru evitarea desicării pe medii de transport.

Examenul microscopic direct orientează uneori diagnosticul către o infecție levurică și uneori poate oferi indicii privind etiologia acesteia.

Produsele patologice pentru care există suspiciunea că ar conține levuri se pot examina microscopic prin:

- Frotiu colorat cu o substanță fluorescentă (Calcofluor, Blankophor). Este metoda optimă de detecție a fungilor în prelevate datorită sensibilității și specificității excelente, doar că necesită microscopie în lumină ultravioletă;
- Frotiu colorat Gram pe care se evidențiază cu ușurință filamentele, pseudohifele, blastosporii însă este inadecvată pentru evidențierea celulelor levurice de dimensiuni mici (ex. *Candida glabrata*);
- Frotiu colorat May-Grünwald-Giemsa este colorația de rutină pentru evidențierea levurilor intracelulare (ex. *Histoplasma*) dar și pentru microscopie directă.

Pe parcursul examenului microscopic se urmărește cu atenție prezența, forma și dimensiunile formațiunilor caracteristice levurilor: blastospor, pseudo-hife, hife (filamente).

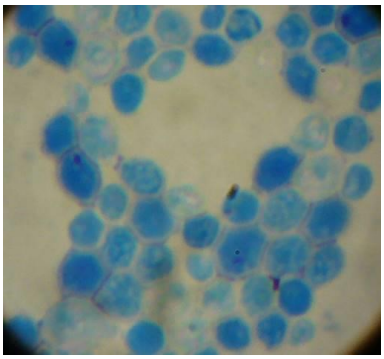


Figura 59. Frotiu - *Candida albicans* albastru de metilen

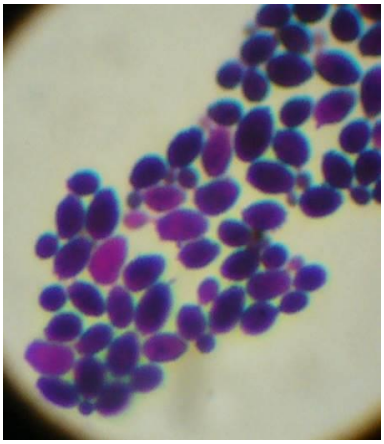


Figura 60. Frotiu - *Candida albicans* Gram

Însămânțarea se face prin epuizare pe medii solide fie în plăci Petri fie în tuburi. Se asigură astfel separarea fungilor cu semnificație clinică de cei contaminanți și se inhibă prin diluare eventualele substanțe antimicrobiene cu rol antifungic.

Mediul utilizat este agar Sabouraud aditivat cu cloramfenicol. Acest mediu permite o bună dezvoltare și supresează multiplicarea eventualelor bacterii contaminante. Dezavantajul acestui mediu este că nu reușește discriminarea culturilor mixte. De aceea, ideal ar fi ca însămânțarea produselor patologice să se facă pe un mediu cromogen, care pe lângă discriminarea între speciile levurice, poate aduce informații esențiale în identificarea agentului etiologic. Astfel într-o singură etapă se poate face atât izolarea cât și identificarea levurilor incriminate.

Numărul speciilor identificabile prin cultivarea pe medii cromogene este variabil în funcție de compoziția mediului.

Figura 61. *Candida albicans* pe mediu Sabouraud

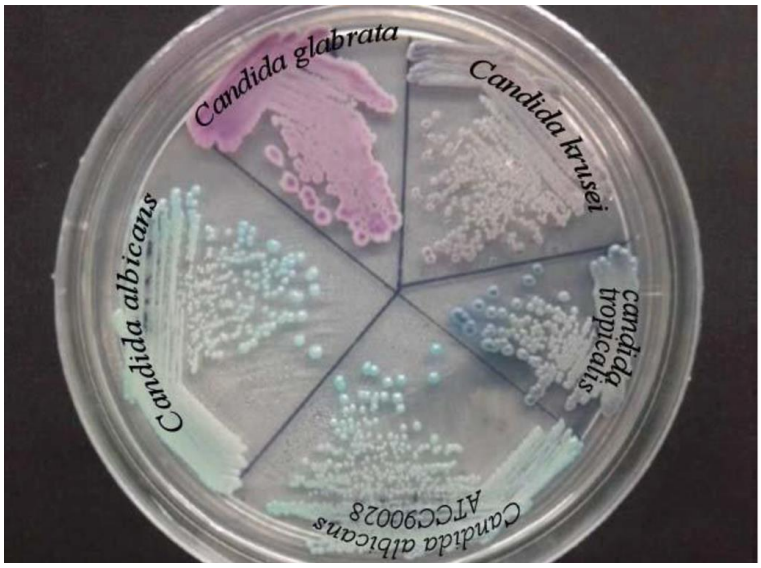


Figura 62. Specii diferite de Candida pe mediu cromogen

După izolarea tulpinilor fungice și precizarea semnificației clinice (peste 50 colonii/tampon și prezența reacției inflamatorii), se trece la identificarea specie folosind teste de rutină. Se vor utiliza doar tulpini purificate, oricare contaminare bacteriană sau fungică anulând rezultatul identificării.

Testele biochimice sunt utilizate pentru identificarea levurilor de interes medical, în laboratorul clinic. Aceste teste nu reușesc să elucideze de fiecare dată apartenența taxonomică a unei tulpini și sunt necesare teste suplimentare, în principal de biologie moleculară, pentru identificarea acesteia.

Deoarece testele de biologie moleculară bazate pe analiza ADN-ului sunt accesibile doar unor laboratoare, utilizarea testelor biochimice și a caracterelor morfologice este soluția acceptabilă pentru laboratoarele clinice.

Aceste teste pot identifica un număr diferit de specii, cum ar fi:

- O singură specie: Candida albicans Screen (Remel), RTT Glabrata
- (Fumouze);
- Câteva specii: CandiSelect (Bio-Rad), CHROMagar Candida (BD Sciences), Candida ID2 (bioMerieux), Chromogenic Candida Agar (OXOID);
- Specii multiple: ID 32C (bioMerieux), RapID Yeast Plus Panel (Remel)

Figura 63. API *candida albicans*

Figura 64. API *candida tropicalis*

Figura 65. Candifast

7. Diagnosticul de laborator al infecțiilor virale

Diagnosticul de laborator al infecțiilor virale se poate efectua prin numeroase metode, cele mai utilizate fiind izolarea și identificarea agentului viral (metode directe), fie prin teste serologice (diagnostic serologic).

Diagnosticul direct

Virusurile datorită dimensiunilor foarte mici (20-300 nm) nu pot fi observate la microscopul optic, ci doar la microscopul electronic.

Infecțiile virale pot fi diagnosticate ocazional utilizând microscopia electronică prin vizualizarea directă a particulelor virale. Metoda prezintă avantajul de a putea fi vizualizate mai multe tipuri de particule virale. Dezavantajele includ costul și complexitatea întreținerii microscopului electronic.

Anumite tehnici asociate microscopiei pot evidenția virusurile în țesuturile obținute prin biopsie sau necropsie.

Prin imunofluorescență se utilizează anticorpi marcați fluorescent care detectează antigenele virale la nivelul țesuturilor (virus herpes simplex 1 și 2, virusul varicella-zoster). Este aplicabilă ca metodă de diagnostic în laboratoare care dispun de microscop cu fluorescență.

De obicei în laboratoarele de cercetare virusologică se face examinarea electronomicroscopică, deoarece aceste laboratoare au în dotare microscop electronic. Se face de obicei examinarea lichidelor veziculare.

Recoltarea probelor biologice în scopul diagnosticului direct virusologic se face pe medii aseptice tamponate care vor fi decontaminate bacterian fie prin adăugare de antibiotice, fie prin centrifugare sau filtrare.

Virusurile supraviețuiesc, trăiesc și se multiplică doar în interiorul unei celule vii (culturi de celule, animale de experiență, ouă embrionate). Prezența virusurilor în structurile vii, utilizate pentru izolare, este pusă în evidență prin modificări histologice caracteristice sau prin evidențierea unor agenți virali hemaglutinanți.

Identificarea virusurilor odată cultivate se face prin RFC (reacție de fixare a complementului) sau HAI (reacție de hemaglutinoinhibare)

- Inocularea pe animale de experiență se face subcutan, intavenos, intraperitoneal, intranazal, intracerebral, prin scarificare corneeană sau cutanată. După inoculare, animalul prezintă semne de boală, iar virusul replicat va fi identificat în sânge și țesuturi.
- Inocularea pe ouă embrionate a suspensiilor virale se face pe ouă de găină, la care se verifică prin transluminare la ovoscop viabilitatea și dezvoltarea embrionului. Se poate face inoculare intravitelin, intraalantoidian sau intraamniotic. Cu același produs patologic se inoculează întotdeauna 2-3 ouă, care se incubează la temperatura de 34-35ºC, timp de 2-3 zile. După incubare se sacrifică embrionul și se

examinează lichidele și țesuturile care pot prezenta modificări macroscopice și/sau microscopice. Lichidele embrionare pot prezenta proprietăți caracteristice virusului replicat (capacitate hemaglutinantă). Reacția HAI permite evidențierea virusurilor hemaglutinante.

- Inocularea în culturi celulare a suspensiilor virale. Liniile celulare pot fi de provenienţă umană (HeLa) sau animală (Vero). În diagnosticul virusologic pe linii celulare, se introduce suspensia virală obținută din produsul patologic împreună cu mediul de întreținere. Se incubează la 37ºC iar replicarea virală este demonstrată prin ECP (efect citopatogen). Culturile virale prezintă atât avantaje cât și dezavantaje, comparativ cu alte metode de diagnostic. Culturile virale sunt singurele dintre metodele diagnostice care izolează virusuri viabile ce pot fi păstrate pentru studii viitoare. Dezavantajele metodei ar fi: costul ridicat, timpul relativ prelungit de determinare virală, dar și varietatea virusurilor.

Diagnosticul serologic al infecțiilor virale

Imunodiagnosticul reprezintă metoda cea mai accesibilă de diagnostic în infecțiile virale și constă în identificarea anticorpilor antivirali în serul bolnavilor.

Se pot realiza 2 tipuri de investigații:

- Detecția de anticorpi antivirali de tip IgM (care apar în răspunsul imun primar). Semnifică o infecție acută, au viață scurtă deoarece dispar în câteva săptămâni. De obicei se utilizează testul ELISA
- Anticorpi antivirali de tip IgG care apar în răspunsul imun secundar (apar după o perioadă de cel puțin 2-3 săptămâni de la o infecție virală și care persistă mai mulți ani, uneori chiar toată viața.
- Se poate determina seroconversia. Se recoltează două probe de sânge. În proba I nu există anticorpi, apoi în proba a II a apar anticorpi specifici virusului de detectat sau se determină creșterea semnificativă a titrului de anticorpi între cele două probe (de cel puțin patru ori).

Testele enzimatice sunt cele mai des utilizate în diagnosticul infecțiilor virale. Testul ELISA (enzime-linked-immunosorbant-assay) pune în evidență anticorpii antivirali prin tehnică indirectă.

Metodele moleculare de diagnostic sunt cele mai folosite în determinarea și identificarea agenților patogeni pentru care culturile și serologia sunt greu de realizat. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) prezintă sensibilitate și specificitate înaltă și de aceea reprezintă o metodă de elecție pentru identificarea directă a acidului nucleic. Metoda se bazează pe abilitatea ADN sau ARN polimerazei de a copia secvențe a unor gene țintă folosind nucleotide complementare. PCR este o metodă eficientă deoarece permite detectarea prin intermediul aceleași reacții, a mai multor agenți ce pot produce același sindrom clinic.

8. Diagnosticul de laborator în hepatite și SIDA

O înțelegere clară a hepatitei virale este esențială pentru toți medicii stomatologi, în special în ceea ce privește sechelele grave ale bolii și potențialul de transmitere a infecției în clinica dentară.

Infecțiile virale sunt de departe cel mai important agent al hepatitei. Marea majoritate a bolilor hepatice virale sunt una dintre următoarele:

- hepatita A (hepatita infecțioasă, hepatită cu perioadă de incubație scurtă)
- hepatita B (hepatita serică)
- hepatita C
- hepatita D (hepatita delta)
- hepatita E (hepatită transmisă enteric)
- hepatita G

Acestea pot fi clasificate în două grupuri, în funcție de calea de transmitere virală:

- calea fecal-orală: hepatita A și hepatita E (foarte puțin probabil să fie transmise în stomatologie)
- calea parenterală: hepatita B, C, D și posibil hepatita G (pot fi transmise în stomatologie)

Virusurile hepatitelor B, C și D se pot transmite trasplacentar (de la mamă la făt), posttransfuzional, pe cale sexuală. O cale importantă de transmitere este reprezentată de manoperele invazive medicale (prin ace de seringă, manopere chirurgicale, endoscopii, cateterisme, dializă, extracții dentare și alte manopere chirurgicale sângerânde)

8.1. Hepatita B

Virusul hepatitei B este un virus ADN, anvelopat ce aparține familiei Hepadnaviridae. Perioada de incubație este de 4-26 săptămâni.

Virusul în general poate prezenta două forme diferite:

- particulă completă (particula Dane - formată din nucleocapsidă și anvelopă)
  - Capsida prezintă doi constuienți antigenici: AgHBe și AgHBc. AgHBc poate fi identificat prin tehnici imunohistochimice, în urma punctiei biopsie hepatică. AgHBc este clivat intrahepatocitar rezultând AgHBe.
- particula incompletă, lipsită de acid nucleic, format exclusiv din AgHBs. La nivelul anvelopei se găsește cel de-al treilea antigen, cel de suprafață (AgHBs).

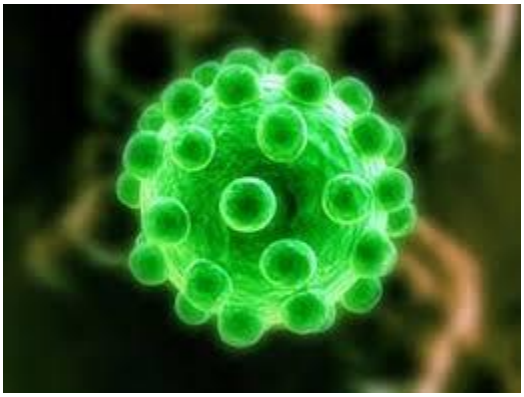


Figura 66. Virusul hepatic B

Prezența virusului în organism determină un răspuns imun de tip umoral caracterizat prin sinteza de anticorpi împotriva tuturor celor trei antigene:Ac anti-HBs, Ac anti-HBc, Ac anti-HBe.

Primele semne ale unei infecții cu virus hepatitic sunt modificările unor parametri biochimici: creșterea marcată a enzimelor hepatice (GOT și GPT), dar și creșterea markerilor colestazei (fosfataza alcalină și GGT-gama glutamil transpeptidaza). Electroforeza arată creșterea fracțiunilor gama și beta-globulinică și scade fracțiunea albuminică. De asemenea se evidențiază tulburări ale metabolismului pigmenților biliari (urobilinogen urinar).

Diagnosticul direct

Evidențierea virusului în.

●Secțiuni hepatice se evidențiază prin ME particolele virale și prin IF antigenele virale

●Sânge se evidențiază prin ME, IEM particolele Dane, antigenul de suprafață

Diagnosticul serologic

●AgHBs se poate evidenția prin: hemaglutinarea pasivă inversă, RIA (radioimmunoassay), testul imunoenzimatic ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

●AgHBe prin reacția ELISA

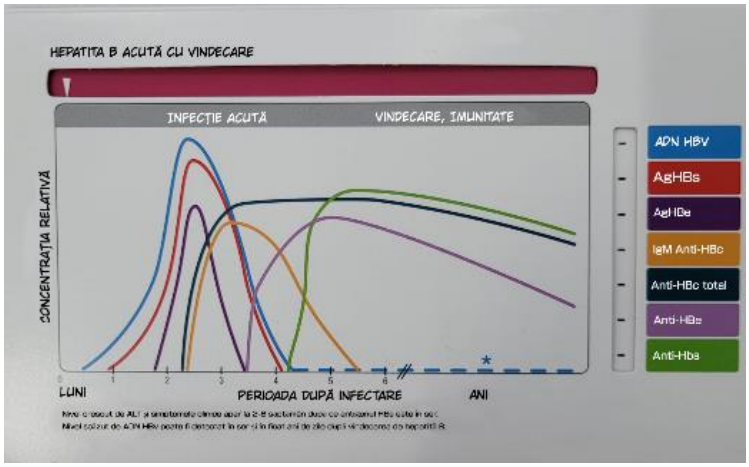
●AC anti HBe- IgM anti-HBe depistare prin ELISA și confirmare prin RIA

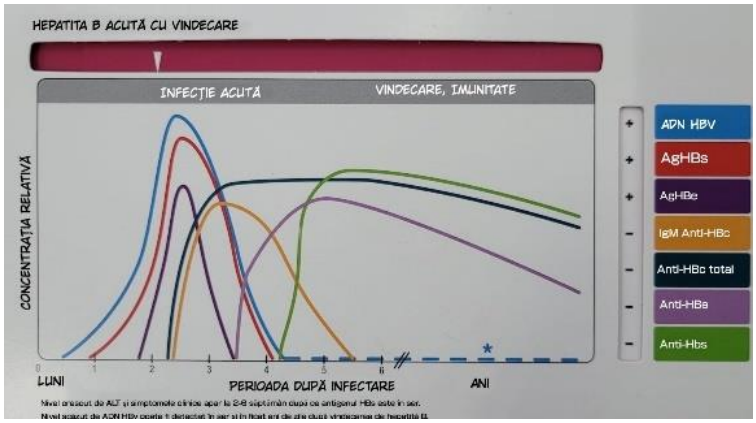
●AC anti HBc- IgM anti-HBc depistare prin ELISA și confirmare prin RIA

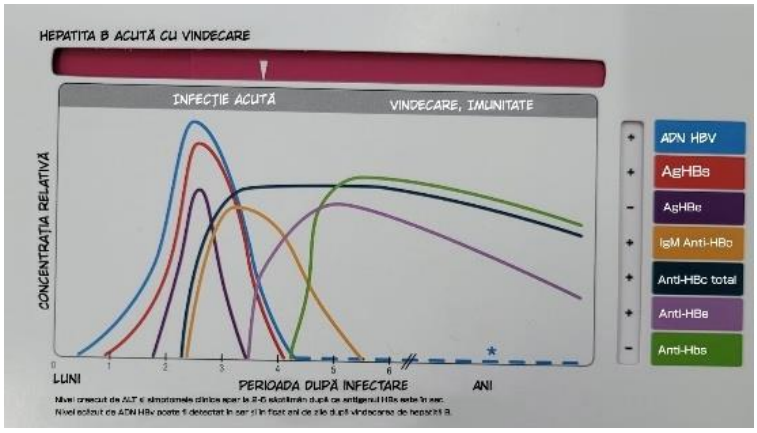
●AC anti HBs depistare prin imunodifuzie în gel, contrimunoelectroforeză, hemaglutinare pasivă indirect

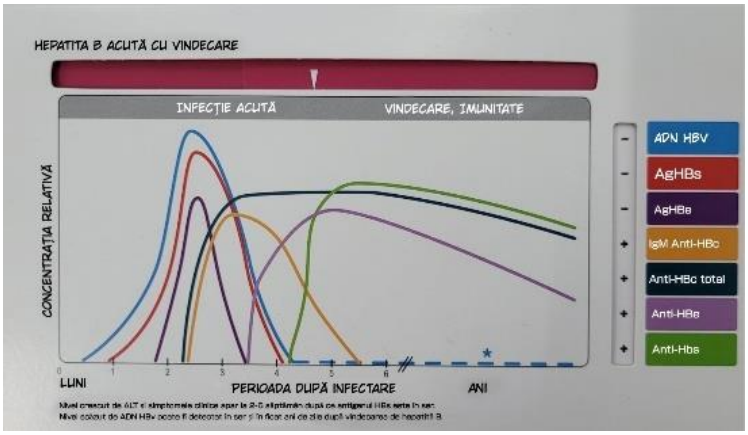
Tabel nr. 1. Semnificația markerilor infecției cu VHB

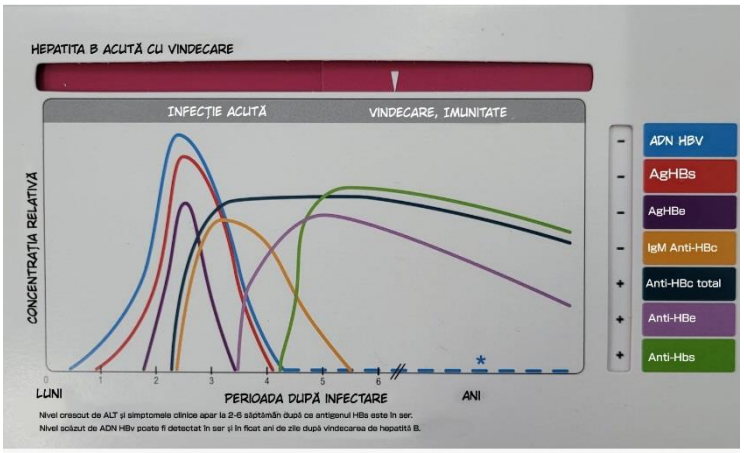
Markerul infecției cu VHB	Semnificație diagnostică
AgHBs	Purtător VHB, nu este de fiecare dată infectiv
AgHBe	VHB în stare replicativă, infectivitate
AgHBc în țesuturi	VHB în stare replicativă, infectivitate
Ac anti-HBc IgM	Infecție activă sau reinfecție. Infecția cu VHB se poate croniciza
Ac anti-HBc IgG	Persistența infecției dacă titrul este mare Vindecarea (instalarea imunității) dacă titrul este mic și este asociat cu Ac anti-HBs
Ac anti-HBs	Vindecarea (imunitate)
Ac anti-HBe	Dispariția infectivității


HEPATITA B ACUTĂ CU VINDECARE
INFECȚIE ACUTĂ
VINDECARE, IMUNITATE
CONCENTRAȚIA RELATIVĂ
ADN HBV
AgHBs
AgHBe
IgM Anti-HBc
Anti-HBc total
Anti-HBe
Anti-Hbs
0
1
2
3
4
5
6
LUNI
PERIOADA DUPĂ INFECTARE
ANI


HEPATITA B ACUTĂ CU VINDECARE
INFECȚIE ACUTĂ
VINDECARE, IMUNITATE
CONCENTRAȚIA RELATIVĂ
ADN HBV
AgHBs
AgHBe
IgM Anti-HBc
Anti-HBc total
Anti-HBe
Anti-Hbs
0
1
2
3
4
5
6
LUNI
PERIOADA DUPĂ INFECTARE
ANI


HEPATITA B ACUTĂ CU VINDECARE
INFECȚIE ACUTĂ
VINDECARE, IMUNITATE
CONCENTRAȚIA RELATIVĂ
ADN HBV
AgHBs
AgHBe
IgM Anti-HBc
Anti-HBc total
Anti-HBe
Anti-Hbs
0
1
2
3
4
5
6
LUNI
PERIOADA DUPĂ INFECTARE
ANI





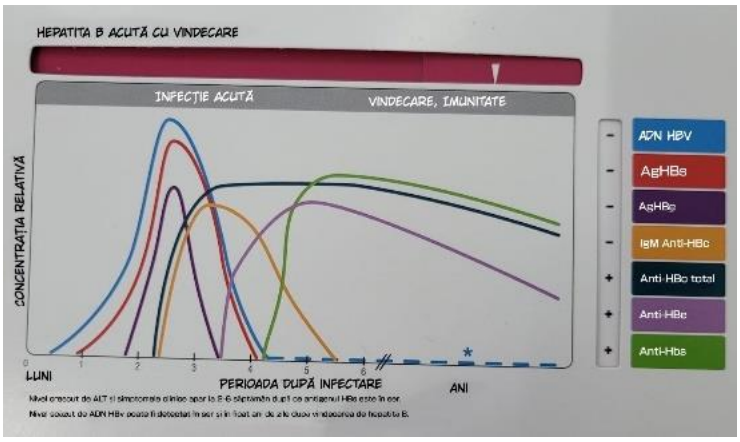


Figura 67. Evoluția serologiei în hepatita B

8.2. Hepatita C

Virusul hepatitei C este un virus ARN, anvelopat cu o perioadă de incubație de 2-20 săptămâni. Aparține familiei Flaviviridae. Majoritatea hepatitelor post-transfuzionale

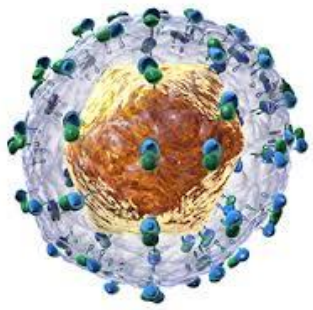


Figura 68. Virusul hepatic C

Testele ELISA au o sensibilitate și specificitate crescută, ele evidențiază anticorpii în raport cu proteinele structurale sau nonstructurale ale virusului.

Tehnica RIBA (recombinant immunobloting assay) sau tehnica imunoamprentelor se folosește pentru evitarea reacțiilor fals pozitive.

Confirmarea infectivității se face prin amplificare genică și decelarea ARN/ HCV în plasmă.

Tabel nr. 2. VHC-markerii infecției

Detectarea Ac anti VHC- test screening
Detectarea ARN VHC – teste de confirmare
Genotiparea VHC utilă pentru a aprecia prognosticul și răspunsul la tratament

8.3. Hepatita D

Virusul hepatitei D este un virus ARN anvelopat. Nu se poate multiplica decât în prezența virusului hepatitei B deoarece este un virus incomplet. Perioada de incubație este de 2-12 săptămâni. Se poate transmite concomitent cu VHB (coinfecție) sau se poate transmite la o persoană infectată anterior cu HBV (suprainfecție).

Se datorează VHC, ELISA, RIA.

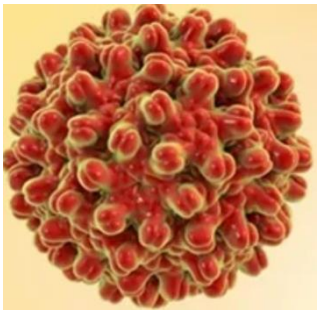


Figura 69. Virusul hepatic D

Tabel nr. 3. VHD-markerii infecției

AgHBs prezent
AgHD prezent
Ac anti-HD totali
Ac anti-HD de tip Ig M –infecție acută cu VHD
Ac anti-HD de tip Ig G – infecție cronică cu VHD
Detectare ARN-VHD prin PCR

Metodele de diagnostic utilizate pentru evidențierea markerilor specifici VHD sunt ELISA, RIA.

8.4. Hepatita A

Virusul hepatitei A este un virus ARN, neanvelopat ce aparține familiei Picornaviridae. Se transmite pe cale fecal-orală și se elimină prin materiile fecale. Perioada de incubație este de 2-7 săptămâni (media 30 zile).

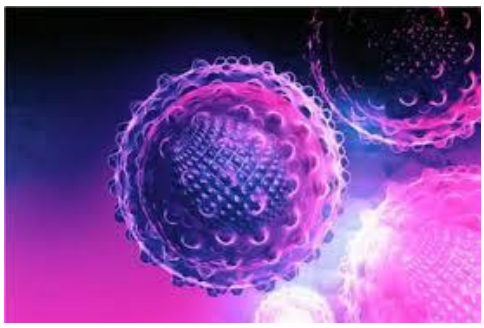


Figura 70. Virusul hepatic A

Diagnosticul constă în evidențierea virusului în filtratul de materii fecale prin ME. Diagnosticul serologic evidențiază Ac anti-VHA de clasă IgM care semnifică o infecție acută și cei de clasă IgG care apar în convalescență și care conferă protecție.

Metodele de diagnostic utilizate sunt ELISA, RIA.

8.5. Hepatita E

Virusul hepatitei E este un virus ARN neanvelopat, aparținând familiei Caliciviridae. Se transmite pe cale fecal-orală prin consum de apă contaminată.

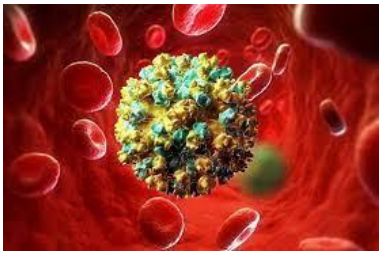


Figura 71. Virusul hepatic E

Evidențierea virionilor în filtratul de materii fecale prin ME și identificarea prin IEM. Evidențierea anticorpilor anti-VHE se face pentru detectare prin ELISA iar pentru confirmare RIA. Deasemenea poate fi diagnosticată infecția prin Western blot și PCR assay.

8.6. Infecția HIV

Virusul imunodeficienței umane dobândite (HIV) este un retrovirus cu perioada de incubație lungă. Este un virus ARN, a cărui capsidă învelește cele două catene identice de ARN și subunitățile reverstranscriptazei. Aici sunt prezenți cei doi determinanți antigenici majori (p24 și p25) utili în diagnosticul de laborator.

La nivelul anvelopei sunt mai mulți determinanți antigenici majori, cu structură proteică (gp120, gp41, p18). Aceste structuri proteice prezintă o mare variabilitate care permite apariția de subtipuri cu noi proprietăți antigenice nu- mite mutante. Structurile țintă primare ale virusului sunt monocitele și limfocitele T helper (Th).

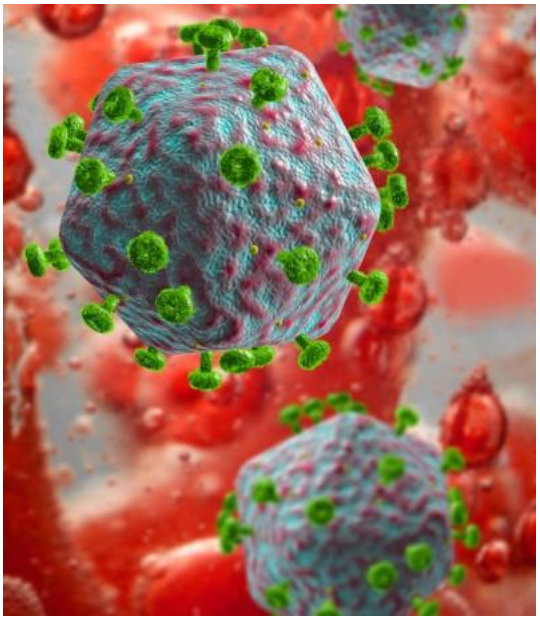


Figura 72. Virusul HIV

Infecția parcurge următoarele etape:

- Infecția acută este frecvent asimptomatică sau simptomele pot mima o mononucleoză infecțioasă (hepatosplenomegalie, adenopatie generalizată) sau o infecție cu citomegalovirus (encefalopatii, neuropatii, erupții cutanate)

- Stadiul cronic poate fi și el uneori asimptomatic. În acest stadiu apar semnele și simptomele patognomonice (limfadenopatie generalizată, diaree apoasă care trenează mai mult de o lună, febră (>38 ºC), scădere în greutate). În această etapă a bolii sunt frecvente infecțiile cu germeni oportuniști (*Candida* spp.) și leucoplakia păroasă a limbii

- ARC (AIDS Related Complex) este a treia etapă a bolii în care se evidențiază cel puțin două semne patognomonice descrise în etapa de infecție cronică

- Sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA) se caracterizează prin creșterea frecvenței infecțiilor cu germeni oportuniști cu risc vital (*Cryptosporidium parvum, Toxoplasma gondii, Strong yloides stercoralis, Mycobacterium spp.*), apariția stărilor precanceroase (leucoplakia păroasă a limbii), a leucemiilor și tumorilor solide (sarcom Kaposi, limfoame maligne). Sunt descrise cu frecvență mare cariile și abcesele dentare.

Examenele de laborator pun în evidență modificări nespecifice. Hemoleucograma evidențiază pancitopenie, uneori severă (leucopenie cu limfopenie, anemie, trombocitopenie). În context clinic sugestiv se completează diagnosticul de laborator cu teste serologice specifice, care pun în evidență antigenele și anticorpii virali.

Primul pas în serodiagnostic este testul ELISA sau teste screening de aglutinare pentru anticorpii serici. Până la aproximativ 2% din testele ELISA sunt fie fals pozitive, fie fals negative: prin urmare, un ELISA pozitiv trebuie testat în eșantioane duplicat. Dacă două sau mai multe din ultimele trei rezultate ELISA sunt pozitive, testarea confirmatorie trebuie făcută printr-un test Western blot.

Principiile și etica diagnosticului sunt:

- Aplicați minimum două metode de diagnostic diferite
- Repetați testul 2-3 luni mai târziu, deoarece există o perioadă de timp (numită fereastră serologică) între dobândirea infecției și dezvoltarea anticorpilor
- Nu divulgați rezultatele pozitive până la confirmarea cu o altă metodă de diagnostic. Mențineți confidențialitatea rezultatelor în permanență

Alte metode de diagnostic de laborator includ:

- izolarea virusului în limfocite din sângele periferic: o metodă limitată la laboratoarele de cercetare, datorită faptului că este laborioasă și necesită un timp îndelungat
- detectarea acizilor nucleici virali sau a antigenelor prin reacția de polimerizare în lanț -PCR (foarte utilă pentru detectarea HIV la nou-născuți, deoarece plasma lor este contaminată cu anticorpi HIV de la mamă). O încărcătură virală ridicată în plasmă persoanelor infectate determină o evoluție mai rapidă la SIDA decât o încărcătură virală scăzută.

9. Diagnosticul de laborator al infecțiilor parazitare

Paraziții sunt organisme vii care trăiesc și se hrănesc pe seama altor organisme vii considerate gazde.

Ei sunt clasificați în:

- Ectoparaziți - care trăiesc pe suprafața corpului uman.
  - Exemple: *Sarcoptes scabie*, speciile genului *Pediculus.* Determină asupra gazdei umane un complex de fenomene cunoscute ca infestație.
- Endoparaziți – care trăiesc în interiorul organismului uman.
  - Exemple: celule - *Toxoplasma gondii*; țesuturi - *Trichinella spiralis*; cavități - *Ascaris lumbricoides*. Complexul de fenomene declanșate gazdei de către acești paraziți se numește infecție.

Cea mai mare parte din paraziții implicați în patologia umană au ca habitat diferite segmente ale tubului digestiv, materiile fecale reprezintă produsul patologic examinat în vederea punerii în evidență a diferitelor forme de existență a paraziților.

În materiile fecale paraziții pot fi văzuți cu ochiul liber (*Ascaris lumbricoides)* sau la microscop (ouă, larve, chiști).

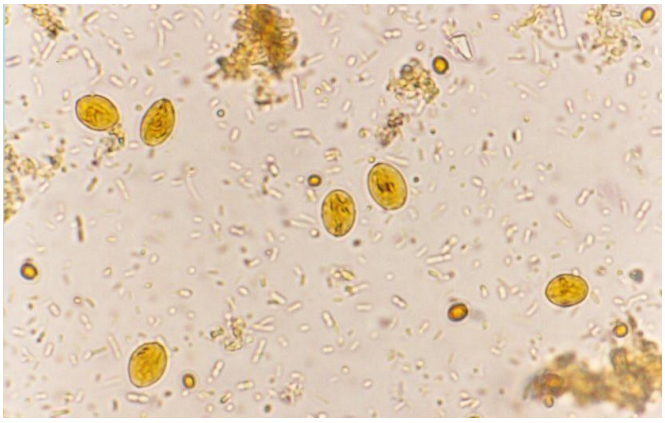


Figura 73. Examen coproparazitologic (ouă Giardia lamblia)

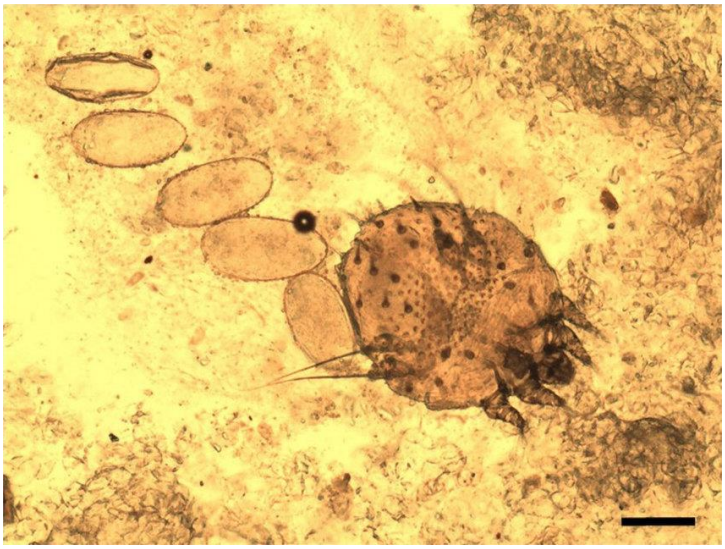


Figura 74. *Sarcoptes scabie*

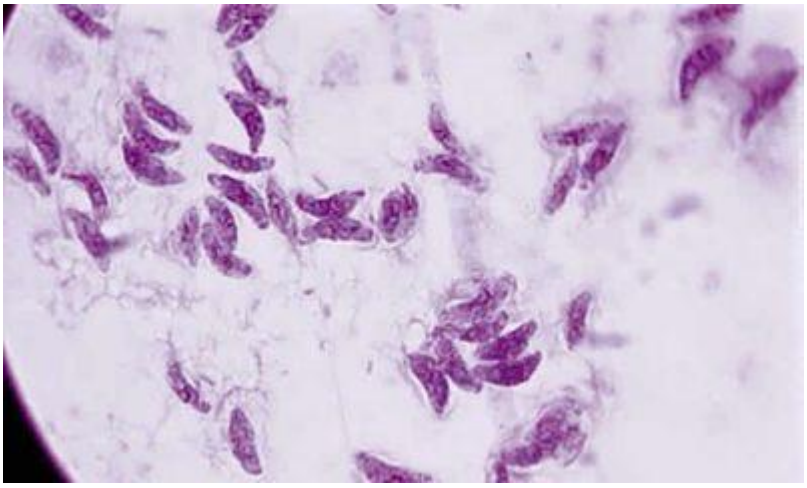


Figura 75. *Toxoplasma gondii*

Figura 76. *Trichinella spiralis*

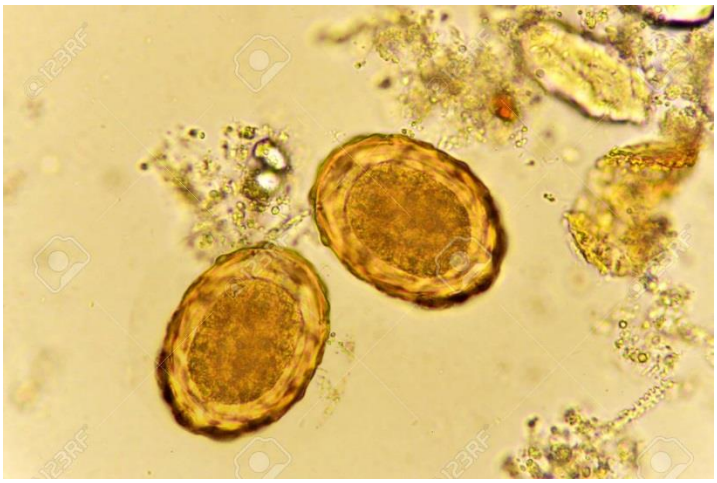


Figura 77. Ouă de *Ascaris lumbricoides*

Examenul coproparazitologic

Examenul de rutină coproparazitologic se efectuează pentru 3 probe, care să fie recoltate la un interval de 3-4 zile.

Recoltarea materiilor fecale se face din scaunul emis spontan (aprox. 2-3 g) din mai multe locuri ale bolului fecal. În cazul unor afecțiuni cronice recoltarea se face după administrarea unui purgativ salin (pentru mobilizarea formelor vegetative de la nivelul ulcerațiilor intestinale). Recoltarea materiilor fecale se poate face prin rectoscopie, de la nivelul leziunilor intestinale.

Recoltarea și transportul se face în recipient de plastic prevăzut la capac cu o lopățică denumit coprorecoltor.

Figura 78. Coprorecoltor

Transportul în laborator în vederea examinării se face cât mai repede deoarece examenul materiilor fecale trebuie efectuat la cel mult o oră de la eliminarea acestora.

Examenul macroscopic constă în examinarea cu ochiul liber urmărind: culoarea, consistența (scaun format, scaun semiformat, scaun moale și diareic), prezența de fragmente sau paraziți întregi (*Ascaris lumbricoides*) dar și prezența de puroi, striuri de sânge, mucus.

Examenul microscopic se face prin metode directe (examen între lamă și lamelă) și prin metode de concentrare.

Examenul direct între lamă și lamelă se poate face cu ser fiziologic, cu soluție Lugol sau cu albastru de metilen. Prin acest examen direct se pot vizualiza: hematii (semnificative pentru ulcerații și hemoragii), PMN- uri care semnifică un proces inflamator, macrofage prezente în infestări parazitare sau în infecții bacteriene, fungi (specii de *Candida*), ouă și larve de helminți, chiști și trofozoiți de protozoare intestinale.

Metode de concentrare

Este o etapă a examinării complete a prezenței paraziților și permite detectarea acestora când sunt eliminați în număr mic.

- **Metoda de concentrare hidrostatică Willis-Hung** se bazează pe fenomenul de flotație a elementelor parazitare într-o soluție suprasaturată de clorură de sodiu.

Rezultatul examenului coproparazitologic menționează absența sau prezența parazitului găsit precum și abundența lui.

La protozoare, examenului coproparazitologic precizează genul și specia agentului parazitar găsit precum și stadiul evolutiv (formă vegetativă sau formă chistică).

Diagnosticul în enterobioză (*Enterobius vermicularis*)

Ciclul biologic al oxiurilor are ca și particularitate procesul de migrare a femelei în pliurile perianale, unde va depune ouăle. Deci ouăle nu sunt prezente decât în mod excepțional în materiile fecale și nu pot fi evidențiate în examenul coproparazitologic. Se practică metoda NIH sau metoda baghetelor colodionate.

Examenul sângelui periferic pentru diagnosticul malariei

Pentru evidențierea paraziților din genul *Plasmodium* se examinează sângele în picătură groasă. Lama se colorează cu soluție Giemsa și se examinează la microscop cu obiectivul de imersie și ulei de cedru.

Avantajul examinării în picătură groasă este că permite examinarea unei cantități mari de sânge concentrate într-o suprafață restrânsă.

Imunodiagnosticul reprezintă un diagnostic de prezumție al infecției parazitare, testele serologice utilizate având diferite grade de sensibilitate și specificitate. Aceste teste constau în punerea în evidență a anticorpilor sau/și antigenelor specifice (*Echinoccocus granulosus* - anticorpi IgG, *Taenia solium* - anticorpi IgG, *Toxoplasma* gondii – anti ToxoIgG și IgM). Testele serologice numai în cazuri excepționale sunt atât de sensibile și specifice încât pot fi considerate dovezi suficiente pentru prezența infecției parazitare (test pentru detecția anticorpilor antitoxoplasmă). În alte infecții parazitare detecția anticorpilor nu este suficientă, ci este doar un indicator pentru prezența unei infecții specifice. În aceste situații trebuie urmărită identificarea directă a parazitului, cu confirmarea prin teste serologice repetate și prin asocierea caracteristicilor clinice și epidemiologice.

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