



UMFT

Universitatea de
Medicină și Farmacie
„Victor Babeș”
din Timișoara

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

ÎNDREPTAR DE LUCRĂRI PRACTICE

AUTORI:

Prof. univ. dr. MONICA LICKER

Conf. univ. dr. ELENA HOGEA

Conf. univ. dr. MIHAELA CRĂCIUNESCU

Conf. univ. dr. FLORIN HORHAT

Șef lucrări dr. DELIA BERCEANU VĂDUVA

Șef lucrări dr. DORINA DUGĂEȘESCU

As. univ. dr. LIVIA STÂNGĂ

As. univ. dr. MIHAELA POPA

As. univ. dr. DELIA MUNTEAN

As. univ. dr. MATILDA RĂDULESCU

As. univ. dr. CIPRIAN PILUȚ

As. univ. dr. IULIA BAGIU

As. univ. per. det. dr. MARIA RUS

Medic primar dr. DANA BREHAR CIOFLEC

2019



Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

www.evb.umft.ro

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

Director: Prof. univ. dr. Andrei Motoc

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Conf. univ. dr. Adrian Vlad

Referent științific: Prof. univ. dr. Andrei Motoc

Indicativ CNCIS: 324

© 2019

Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-8456-43-0

CUPRINS

1. Organizarea și funcționarea laboratorului de microbiologie. Norme de protecție a muncii specifice unui laborator de microbiologie	6
1.1. Dotarea materială.....	7
1.2. Norme de protecția muncii în activitatea unui laborator de microbiologie	11
1.2.1. Măsuri obligatorii.....	11
1.2.2. Protocol de urgență în cazul împrăstierii deșeurilor infecțioase în timpul transportului	12
1.2.3. Protocol de urgență în cazul împrăstierii sângelui sau a secrețiilor	13
2. Sterilizarea	14
2.1. Clasificarea metodelor de sterilizare	15
2.2. Pregătirea materialelor pentru sterilizare.....	19
2.3. Stocarea și menținerea sterilității materialelor după operațiunea de sterilizare.....	21
2.4. Controlul sterilizării	21
3. Antiseptice și dezinfectante	24
3.1. Definiții	24
3.2. Curățarea	25
3.3. Dezinfecția	25
3.3.1. Dezinfecția aerului	29
3.3.2. Dezinfecția mâinilor	29
4. Medii de cultură	32
4.1. Compoziția mediilor de cultură	32
4.2. Clasificarea mediilor de cultură	33
4.3. Sursele de eroare în prepararea mediilor	43

5. Principii generale de diagnostic de laborator al infecțiilor	44
6. Recoltarea și transportul probelor	48
7. Examenul direct macroscopic și microscopic al produselor recoltate.	56
6.1. Examenul macroscopic.....	56
6.2. Examenul microscopic.....	57
8. Izolarea germenilor din probele recoltate pe medii de cultură.....	62
8.1. Cultivarea produselor biologice normal sterile	63
8.2. Cultivarea produselor biologice provenite din sedii populate cu floră normală	64
9. Identificarea germenilor pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, culturale, testelor biochimice, testelor de patogenitate.....	66
9. 1. Metode de identificare a bacteriilor pe baza caractere morfo-tinctoriale pe frotiuri colorate Gram.....	66
9. 2. Metode de identificare a bacteriilor pe baza caracterelor culturale	67
9.3. Metode de identificare a bacteriilor pe baza testelor biochimiceși testelor de patogenitate	68
9.4. Metode de identificare a bacteriilor pe baza testelor moleculare	69
10. Antibiograma, tehnică și citire interpretativă	70
10.1. Tehnica antibiogramei.....	71
10.1.1. Metoda diluțiilor	72
10.1.2. Metoda difuzimetrică	72
10.1.3. Testul E.....	73
10.1.4. Teste utilizate pentru încadrarea tulpinilor în fenotipuri de rezistență.....	74
10.1.5. Determinarea sensibilității la antibiotice prin metode rapide și metode moleculare	76
11. Reacții imunologice în diagnosticul de laborator al infecțiilor	78
11.1. Reacția de aglutinare.....	78
11.1.1. Reacția de aglutinare directă, activă	78
11.1.2. Reacția de aglutinare pasivă (indirectă)	79

11.1.3. Tehnica reacțiilor de aglutinare	79
11.1.4. Aplicațiile practice.....	79
11.2. Reacția de precipitare.....	80
11.2.1. Reacții de precipitare în gel	80
11.3. Reacția de fixare a complementului (RFC)	81
11.4. Reacții cu anticorpi marcați.....	82
11.4.1. Imunofluorescența.....	82
11.4.2. Reacții imunologice cu anticorpi marcați cu enzime - Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	83
11.4.3. Teste RIA (radioimmunoassay)	86
11.4.4. Teste “Western blot”	86
12. Metode rapide de diagnostic în laboratorul de microbiologie.....	87
12.1. Metode de diagnostic bazate pe identificarea acizilor nucleici	87
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	94

1. Organizarea și funcționarea laboratorului de microbiologie. Norme de protecție a muncii specifice unui laborator de microbiologie

Stabilirea existenței microorganismelor patogene sau saprofite în produsele patologice, izolarea, identificarea și studiul biologiei acestora se realizează în laboratoare de microbiologie. Diferențierea microbiologiei în raport cu grupul microbial studiat (bacterii, virusuri, fungi) sau în raport cu interesul urmărit a determinat profilarea laboratoarelor de bacteriologie, virusologie, parazitologie, serologie etc.

În funcție de aria de investigații există laboratoare de microbiologie cu profil diferit, ca de pildă, cele de microbiologie medicală, a mediului (aer, sol, ape), microbiologie alimentară, industrială etc.

Laboratorul de microbiologie medicală are rolul de a stabili:

- diagnosticul infecțiilor (stabilirea agentului infecțios care determină infecția),
- chimioterapia antiinfecțioasă cea mai potrivită,
- controlul eficacității tratamentelor aplicate,
- depistarea purtătorilor sănătoși de germeni microbieni.

Rolul esențial al unui laborator de microbiologie medicală, dintr-un spital constă în stabilirea diagnosticului etiologic al infecțiilor și controlul permanent al potențialului nosocomial în unitatea sanitară respectivă.

Laboratorului de microbiologie al unui institut de învățământ superior îi revine în plus, sarcina de centralizare a datelor de rezistență bacteriană din zona geografică aferentă, precum și de efectuare a testelor de precizie referitoare la mecanismele genetice de transmitere a rezistenței.

Există astăzi numeroși specialiști cu o pregătire nemedicală capabili de a efectua în mod corect diferitele teste de laborator. Medicul bacteriolog este însă cel care corelează semnificația unui izolat în raport cu datele clinice ale pacientului. El trebuie să fie capabil să sugereze clinicianului cele mai eficiente teste de investigare și să se asigure că eforturile laboratorului sunt canalizate în direcția optimă. Trebuie să fie implicat în politica de antibiotice utilizate în diversele sectoare clinice, fapt benefic atât pentru pacient, cât și pentru prevenirea răspândirii speciilor de germeni rezistenți în spital sau în afara acestuia.

Reușita unui diagnostic microbiologic și o conduită terapeutică corectă necesită o bună colaborare între diversele specialități medicale (microbiologie, epidemiologie, specialități clinice).

Pentru ca activitatea laboratorului de microbiologie să fie eficientă, trebuie îndeplinite 4 condiții:

- competența medicului microbiolog, care se rezumă nu numai la cunoașterea biologiei agenților microbieni și posibilitățile de identificare ale acestora, ci și la cunoștințe de fiziologie, fiziopatologie și patologie umană care să-i permită coroborarea constructivă a datelor anamnestice și clinice cu cele obținute în laborator. Medicul microbiolog trebuie de asemenea să aibă cunoștințe în domeniul chimioterapicelor antiinfecțioase,

precum și a farmacodinamicii acestora, pentru a putea recomanda o chimioterapie antiinfecțioasă eficientă și corectă în același timp;

- competența medicului clinician care trebuie să aibă cunoștințe generale de microbiologie pentru a putea aprecia limitele și posibilitățile diagnosticului microbiologic și a interpreta corect rezultatele acestuia. De asemenea, medicul curant trebuie să fie perfect informat asupra probelor biologice care se recoltează în diverse situații, precum și cu privire la modul de recoltare și transportul materialului biologic,
- competența personalului mediu calificat în activitatea specifică laboratorului de microbiologie. În țările UE există o categorie socio-profesională de analiști microbiologi cu o școlarizare postliceală de 2 ani pe diversele specialități de laborator. În țara noastră există asistenții de laborator, cu studii postliceale sau universitare. Acest personal are rolul de a efectua activitatea practică din laborator al cărui rezultat final este identificarea tuturor germenilor existenți într-un produs. Medicului specialist îi revine sarcina de a interpreta rezultatele, de a implica sau nu etiologic germenii evidențiați și de a stabili în funcție de antibiogramă și particularitățile fiecărui pacient în parte, chimioterapeuticul cel mai potrivit.
- dotarea materială. Alegerea, exploatarea și întreținerea corespunzătoare a aparaturii de laborator sunt condiții esențiale în stabilirea unui diagnostic microbiologic corect și a efectuării unei activități de calitate.

1.1. Dotarea materială

Ca orice laborator, și cel de microbiologie trebuie să aibă un spațiu potrivit astfel încât activitatea să se poată desfășura în condiții optime de la primirea probelor până la eliberarea rezultatelor.

1. Încăperi adecvate:

- camera pentru primirea și înregistrarea probelor,
- camere de lucru (numărul lor depinde de complexitatea laboratorului, numărul și varietatea probelor lucrate zilnic). Într-una din camerele de lucru există o boxă. Aceasta este un spațiu închis, separat de restul încăperii prin pereți de sticlă, sterilizat prin ultraviolete, care asigură un plus de siguranță lucrului aseptice. Se utilizează, de pildă, la repartizarea sângelui destinat preparării mediilor de cultură, prelucrării produselor patologice cu contagiozitate deosebită, a produselor ce conțin spori etc.,
- camera pentru prepararea mediilor de cultură (în prezent majoritatea laboratoarelor își comandă medii gata turnate)
- camera pentru spălarea recipientelor care conțin material infecțios,
- camera de sterilizare,
- depozitul de materiale,
- depozitul de reactivi și medii de cultură (sau camera frigorifică),
- grup sanitar.

2. Instalații adecvate

- apă curentă rece și caldă, curent electric, canalizare,
- combustibil gazos,
- instalație de gaze (azot) pentru anaerobioză.

3. Mobilier necesar

- mese de lucru placate cu un material lavabil, neabsorbant, rezistent la acțiunea agenților dezinfectanți, ușor de curățat și dezinfectat (care pot fi prevăzute cu sertare), cu suprafața suficient de mare pentru a se asigura spațiul necesar activităților specifice,
- scaune,
- dulapuri (pentru materialul steril, pentru reactivi și coloranți).

4. Microscopie

Laboratorul trebuie să fie dotat cu microscopie performante deoarece microscopia este primul pas în diagnosticul bacteriologic. Tipurile de microscopie utilizate în mod curent sunt cel cu fond luminos, cu fond întunecat, cu contrast de fază și cu lumină UV.

5. Consumabile de laborator

- lame pentru microscopie: obișnuite sau speciale (cu grosime sub 1 mm, cu marginile șlefuite, din sticlă nefluorescentă sau speciale pentru fluorescență), lamele;
- eprubete de diferite dimensiuni;
- pipete gradate, pipete de plastic de unică folosință, pipete automate (cu volum fix sau reglabil, cu o precizie mare și care permit pipetarea unor cantități de ordinul 5, 10, 30, 50 microlitri), la care se pot adapta distribuitoare cu mai multe vârfuri prin intermediul cărora se pot pipeta cantități egale de reactivi simultan în mai multe godeuri ale unei plăci;
- tuburi de sticlă din care se confecționează în laborator pipete Pasteur (pipete negradate, efilate). Aceste pipete au largă utilizare în laboratorul de microbiologie fiind utile în efectuarea froturilor, însămânțărilor produselor lichide și în general oricărei pipetări în care nu este importantă o cantitate fixă, determinată de lichid;
- baloane, flacoane, cilindri građați, pahare specifice laboratorului de bacteriologie,
- tuburi de centrifugă,
- baghete de sticlă,
- plăci petri (plăcuțe din plastic, de unică folosință, necesare cultivării produselor patologice pe mediile de cultură adecvate).

6. Instrumentarul de laborator

- becuri de gaz la care se execută flambarea. Tipul cel mai frecvent folosit este becul Bunsen care utilizează drept combustibil metanul sau butanul. Temperatura flăcării este în jur de 700-1000°C;

- anse bacteriologice drepte, cu buclă, calibrate. Ele sunt utilizate la însămânțări, repicări și la efectuarea frotiurilor. Se folosesc anse de nichel-crom (care se flambează la fiecare utilizare) sau din material plastic, de unică utilizare;
- seringi din material plastic de diferite dimensiuni, de unică folosință.
- lupe simple, lupe binoculare pentru studiul caracterelor culturale și lupe ecran cu sistem de iluminare pentru numărătoarea coloniilor bacteriene de pe medii solide;
- pense, foarfece, bisturie, stative pentru eprubete de diferite dimensiuni, trepiede, site de azbest, coșuri de sârmă, tăvi emailate etc.;
- truse și baie de coloranți pentru colorarea frotiurilor;
- recipiente și containere utilizate pentru colectarea, ambalarea, transportul, tratarea și eliminarea finală a deșeurilor infecțioase sau înțepătoare-tăietoare rezultate din activitatea de laborator.



Figura 1: Recipient deșeurilor înțepătoare-tăietoare

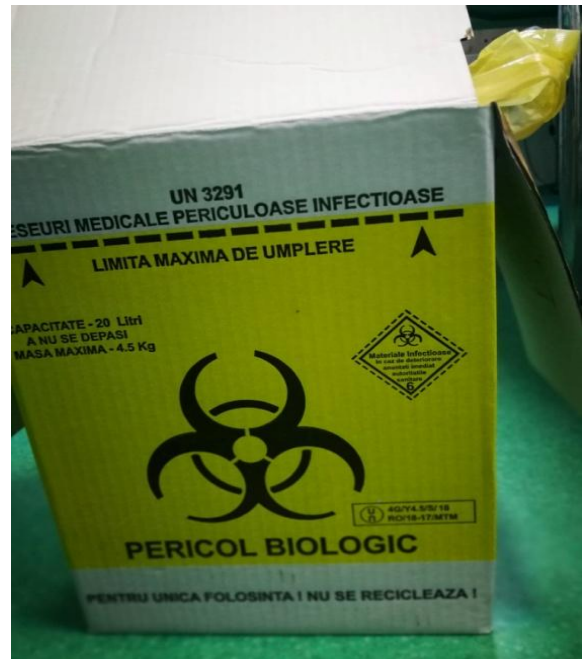


Figura 2: Cutie incinerare deșeurilor periculoase

7. Aparatura din laboratorul de microbiologie

- autoclavul care servește la sterilizarea prin căldură umedă, sub presiune a diverselor obiecte. Autoclavele sunt diferite din punct de vedere al dimensiunii și gradului de automatizare. Manevrarea revine unei persoane calificate;
- pupinelul, sau cuptorul cu aer cald, destinat sterilizării prin căldură uscată a sticlăriei etc.;
- filtre sterilizante destinate sterilizării lichidelor ce nu suportă temperaturi înalte;
- lămpi bactericide cu UV, destinate sterilizării suprafețelor și a aerului din încăperi;
- termostate (cutii metalice cu pereți dubli în interiorul cărora se menține o temperatură constantă). Încălzirea acestora se face electric și asigură menținerea constantă a temperaturii cu ajutorul unui dispozitiv electric cu reglare automată. Astăzi majoritatea

laboratoarelor moderne utilizează pentru izolarea bacteriilor termostate cu CO₂, deoarece acestea se dezvoltă optim în această atmosferă. Există și termostate speciale care creează condiții de anaerobioză;

- frigiderele sunt necesare păstrării la 4°C a unor produse biologice destinate examenului microbiologic, a mediilor de cultură, antibioticelor, vaccinurilor sau chiar a culturilor microbiene;
- congelatoarele cu CO₂ solid sau azot lichid realizează o temperatură de -78°C. Conservarea tulpinilor în aceste congelatoare este cea mai elegantă metodă de păstrare a tulpinilor în laborator. Congelatoarele obișnuite, la care temperatura nu depășește -12°C, pot fi utilizate pentru conservarea serurilor, dar nu a microorganismelor, care își pierd viabilitatea la această temperatură;
- liofilizatorul este un aparat care permite conservarea tulpinilor microbiene prin desicarea (deshidratarea) lor bruscă în vid la -78°C;
- baia-Marie este un vas de formă și dimensiuni variabile în care se menține o temperatură constantă, pe o durată de timp, printr-un agent de încălzire lichid (apa până la 100°C și uleiul de parafină peste această temperatură). Este mult utilizată în serologie deoarece majoritatea tehnicilor prevăd timpi de termostatare (între 55-65°C în general), la prepararea vaccinurilor, unor medii de cultură sensibile la temperaturi ridicate, la sterilizarea prin tyndalizare, pasteurizare etc.;
- linie completă de analizor ELISA, care permite o varietate foarte largă de diagnostice microbiologice și imunologice;
- centrifuga este un aparat folosit pentru separarea prin sedimentare rapidă a particulelor datorită forței centrifuge. În laboratorul de bacteriologie se utilizează centrifugi care asigură 3000 rotații/minut, viteză suficientă pentru sedimentarea bacteriilor și a elementelor celulare dintr-un produs sau cultură;
- balanțe de precizie diferită:
 - balanțe tehnice la care se cântăresc cantități până la 10 kg;
 - balanțe farmaceutice la care se cântăresc cantități de cel puțin 0,01 g;
 - balanțe analitice de diverse sensibilități la care se pot cântări cantități infime de substanțe pentru diverse medii de cultură, suplimente etc.;
- calculatoare, necesare înregistrării, prelucrării și stocării datelor obținute prin investigațiile de laborator. Păstrarea acestor rezultate într-o bază de date le reactualizează în orice moment, ceea ce permite urmărirea evoluției pacienților de-a lungul timpului. De asemenea, este importantă înregistrarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase a tulpinilor circulante pentru a putea urmări comparativ (prin programe de tipul Whonet) evoluția instalării rezistenței la antibiotice în respectivul spital, dar și în alte unități sau zone geografice;
- creioane de scris pe sticlă, hârtie, detergenți, dezinfectante, săpun lichid, prosoape de hârtie).

1.2. Norme de protecția muncii în activitatea unui laborator de microbiologie

Activitatea laboratorului trebuie astfel dirijată încât să se realizeze un circuit de lucru de la primirea sau prelevarea produselor biologice până la obținerea rezultatelor, astfel încât să se excludă erori ce derivă din neatenția sau nepregătirea personalului.

Trebuie evitate toate posibilitățile de contaminare a probelor, precum și a personalului medical care prelucrează produsele, sau de transmitere a unei infecții la alte persoane.

1.2.1. Măsuri obligatorii

1. Purtarea materialului de protecție: halat, mănuși, mască.
2. Repartizarea judicioasă a aparaturii și materialelor de laborator pentru a se realiza o economie în mișcări, prin excluderea deplasărilor inutile.
3. Prevenirea defecțiunilor sau accidentelor prin:
 - pregătirea materialului de rezervă,
 - notarea corespunzătoare a tuturor produselor, recipientelor utilizate, precum și în caietul de lucru, etichetarea soluțiilor.
4. Manipularea corectă a materialului infectant (la recoltare, examinare, însămânțare, inoculare etc.) se asigură prin respectarea normelor de asepsie:
 - sub protecția flăcării (la care se sterilizează ansele și gura recipientelor),
 - sub masa de lucru se află cutiile sau ambalajele pentru deșeuri infecțioase și deșeuri înțepătoare-tăietoare, în care după încheierea tehnicii de lucru se depozitează materialul infecțios,
 - la sfârșitul fiecărei perioade de lucru se spală masa cu soluții dezinfectante lăsându-le să acționeze cel puțin 30',
 - după încheierea lucrului se vor spăla mâinile insistent cu apă și săpun.
5. Se va asigura controlul zilnic al funcționării termostatului, răcirea instalațiilor de gaze, electricitate, fisa de temperatura pentru frigidere.
6. În încăperile unde se lucrează cu produse contaminate sau culturi microbiene **nu se mănâncă, nu se fumează.**
7. Este interzisă așezarea pe masa de lucru a hainelor, servietelor, cărților.
8. Sterilizarea cu ultraviolete a suprafețelor de lucru și a aerului din încăperi se va face cu intensitatea și pe durata de timp corespunzătoare normelor de randament optim al lămpii.

1.2.2. Protocol de urgență în cazul împrăștierei deșeurilor infecțioase în timpul transportului

Procedura recomandată în caz de împrăștiere:

- se izolează zona afectată și nu se lasă zonă nesupravegheată;
- se folosește echipament individual de protecție;
 - Deșeu solid infecțios:
- dacă este împrăștiat în timpul transportului, deșeurile trebuie colectate în recipiente noi pentru deșeurile infecțioase;
 - Deșeu lichid infecțios:
- dacă este împrăștiat în “zone umede” (toaile, băi) se spală zona cu apă din abundență;
- dacă este împrăștiat în “zone uscate” se limitează împrăștierea și aerosolizarea folosind imediat șervete de hârtie sau lavete absorbante pentru a acoperi și colecta lichidul;
- adăugarea unui dezinfectant concentrat dinspre margini spre centrul zonei afectate contribuie la minimizarea aerosolizării;
- materialele contaminate se elimină pe circuitul deșeurilor infecțioase;
- zona accidentului și zonele adiacente se curată și se dezinfectează cu o soluție concentrată de dezinfectant, se lasă să acționeze cca 5-10 min., apoi se spală după procedurile obișnuite;

NOTĂ:

- când există un risc crescut de expunere la aerosoli, se părăsește imediat aria, se izolează și se interzice accesul în zonă;
- se revine la locul accidentului pentru intervenție după depunerea aerosolilor (minim 30 min.);

ATENȚIE:

- se folosește echipament de protecție - mănuși de unică utilizare, mască, ochelari de protecție, halat - pe toată durata procedurii;
- materialele folosite vor fi eliminate prin depozitarea în recipientul pentru deșeurile medicale periculoase și în recipientul pentru deșeurile medicale înțepătoare-tăietoare;
- este informat superiorul responsabil despre incident;

Trusa de intervenție:

- recipient pentru deșeurile infecțioase, recipient pentru deșeurile medicale înțepătoare-tăietoare, o cantitate suficientă de prosoape de hârtie / lavete, pensă pentru colectarea deșeurilor de sticlă spartă, soluție detergent-dezinfectant.

1.2.3. Protocol de urgență în cazul împrăștierei sângelui sau a secrețiilor

Procedura recomandată în caz de împrăștiere a sângelui sau a secrețiilor:

- Împrăștieri mari:
 - se izolează zona afectată pentru a preveni tranzitul persoanelor neautorizate;
 - se acoperă suprafața contaminată cu lavete / prosoape de hârtie;
 - se toarnă deasupra acestora soluție dezinfectantă (timp de acțiune 5-10 minute);
 - se îndepărtează toate resturile, având grijă ca cioburile de sticlă să fie îndepărtate cu un clește sau pensă și plasate în recipientul special pentru deșeuri tăietoare-înțepătoare;
 - deșeurile moi, inclusiv materialele folosite pentru a curăța zona, se colectează în recipient pentru deșeuri infecțioase;
 - zona contaminată și curățată se tratează cu dezinfectant concentrat și apoi se spală cu apă și detergent;
- Împrăștieri mici:
 - se curăță zona cu lavete absorbante sau cu prosoape de hârtie îmbibate în soluție dezinfectantă concentrată;
 - se spală cu apă și detergent;

ATENȚIE:

- se folosește echipament de protecție - mănuși de unică utilizare, mască, ochelari de protecție, halat - pe toată durata procedurii;
- toate materialele folosite vor fi eliminate prin depozitarea în recipientul pentru deșeuri medicale periculoase;
- este informat superiorul responsabil despre incident.

Trusa de intervenție:

- recipient pentru deșeuri infecțioase, o cantitate suficientă de prosoape de hârtie / lavete, pensă pentru colectarea deșeurilor de sticlă sparta, soluție detergent-dezinfectant.

2. Sterilizarea

Sterilizarea este una din marile realizări ale microbiologiei, deoarece introducerea ei în practica medicală curentă a influențat evoluția specialităților cu profil chirurgical, epidemiologia bolilor infecțioase, igiena și aproape toate celelalte specialități medicale.

Cuvântul “steril” își are originea în limba latină și se traduce prin “neroditor”. Sterilizarea, care este un termen absolut, cuprinde ansamblul de tehnici fizice și chimice care elimină toți germii viabili (bacterii, spori, fungi, virusuri, paraziți) de pe suprafața sau interiorul unui corp. Un obiect steril este deci lipsit de orice formă de viață. Criteriul de verificare a sterilității constă în pierderea capacității de multiplicare a microorganismelor atunci când sunt introduse într-un mediu favorabil. Sterilizarea nu presupune numai înlăturarea completă a microorganismelor, ci și prevenirea recontaminării obiectelor sterilizate.

În alegerea metodei de sterilizare trebuie să ținem seama de calitățile fizice și chimice ale materialului supus sterilizării, precum și de sensibilitatea microorganismelor, care este diferită față de diverșii agenți sterilizanți.

Față de acțiunea căldurii umede, de pildă, microorganismele prezintă 4 grade de rezistență :

- gradul 1 de rezistență cuprinde : bacteriile vegetative, ciupercile și virusurile. Ele sunt distruse, cu unele excepții (virusul hepatitei B), în mediu apos la temperaturi în jur de 100°C în câteva minute.
- gradul 2 cuprinde sporii speciilor din genul *Bacillus* (*B.anthraxis*, *B.subtilis*),
- gradul 3 cuprinde speciile din genul *Clostridium* (bacilul tetanic, botulinic și bacilii gangrenei gazoase),
- gradului 4 îi aparțin sporii bacteriilor termofile ale căror forme vegetative se înmulțesc la o temperatură de peste 50°C. Acești spori sunt capabili de o supraviețuire de chiar 30' la 134°C, dar sunt lipsiți de importanță medicală datorită temperaturii de multiplicare.

Față de agenții chimici, sporii sunt mult mai greu de înlăturat decât formele vegetative ale bacteriilor. Alegerea unui antiseptic sau dezinfectant presupune cunoașterea precisă a rezistenței microorganismelor posibil prezente, precum și a concentrației active a substanțelor respective.

În procesul de sterilizare trebuie avute în vedere anumite reguli generale:

- dispozitivele și materialele de unică folosință nu vor fi niciodată reprocesate în vederea reutilizării,
- toate dispozitivele medicale și materialele care urmează a fi sterilizate trebuie curățate prin metode fizice și dezinfectate înainte de a fi supuse unui proces de sterilizare standardizat,
- organizarea activităților propriu-zise de sterilizare, precum și a activităților conexe (curățarea, dezinfecția și împachetarea, stocarea și livrarea) va ține cont de necesitatea respectării circuitelor funcționale. Este interzisă realizarea acestor activități în alte spații decât cele destinate acestor operațiuni.

Stația centrală de sterilizare din unitățile sanitare de orice tip trebuie să fie amenajată într-un spațiu special destinat, cu separarea completă a circuitului steril de cel nesteril.

2.1. Clasificarea metodelor de sterilizare

A. Metode fizice:

1. sterilizarea prin căldură umedă – la autoclav
2. sterilizarea prin căldură uscată – la pupinel / etuvă

B. Metode fizico-chimice:

1. sterilizarea cu oxid de etilenă
2. sterilizarea cu plasmă.

A. Metode fizice:

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

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

Indicațiile sterilizării la autoclav:

- materialul infecțios din laborator (saci cu infecte),
- medii de cultură,
- tampoane de vată,
- obiecte din cauciuc (sonde, dopuri, tuburi de dren),
- materiale din bumbac (tifon, vată, câmpuri operatorii, halate).

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

Trebuie respectate instrucțiunile de utilizare din cartea tehnică a aparatului, cu privire la temperatura, presiunea și timpul de sterilizare recomandate de producător, în funcție de tipurile de materiale de sterilizat ambalate. Presiunea, temperatura și timpul de sterilizare reprezintă valori de siguranță pentru eficacitatea sterilizării în funcție de aparat.



Figura 3: Tipuri de autoclave (a. Autoclav automat cu vacuum fracționat)

2. Sterilizarea prin căldură uscată - la pupinel / etuvă se face la 180°C timp de 1 oră sau la 160°C - două ore, asigurându-se astfel carbonizarea formelor vegetative, precum și ale sporilor tuturor microorganismelor. Temperatura de 180°C/160°C este necesară, deoarece căldura uscată are o putere de pătrundere mai redusă. Obiectele se scot din aparat după răcirea aerului din interior sub 100°C.

Indicațiile sterilizării la pupinel:

- sticlăria de laborator: eprubete, baloane, tuburi, pipete gradate, pipete Pasteur, cutii petri, pânii, pahare Berzelius etc.,
- obiecte din porțelan: mojar, capsule,
- instrumentar chirurgical și stomatologic,
- unele pulberi: talc, uleiuri (parafina).

Nu sterilizăm la pupinel: soluții apoase, obiecte din cauciuc, țesături și fibre din bumbac, materialul contaminat din laborator.

Ciclul complet de sterilizare la pupinel cuprinde următoarele faze:

- a) faza de încălzire a aparatului (intervalul de timp dintre momentul pornirii aparatului și cel al începerii creșterii temperaturii), durata depinde în funcție de aparat;
- b) faza de latență sau omogenizare (intervalul de timp în care are loc propagarea și creșterea temperaturii pentru atingerea temperaturii de sterilizare în cutiile metalice/pachetele din coșuri), durata fiind în funcție de aparat, de natura și de cantitatea materialului de sterilizat;
- c) faza de sterilizare, durata fiind în funcție de temperatură: 180°C timp de 1 oră sau la 160°C - două ore;
- d) faza de răcire (durata fiind în funcție de aparat, natura și cantitatea materialului de sterilizat).

Un ciclu complet de sterilizare durează aproximativ 4-5 ore. Timpul de sterilizare se măsoară din momentul atingerii temperaturii de sterilizare în interiorul încălzirii.

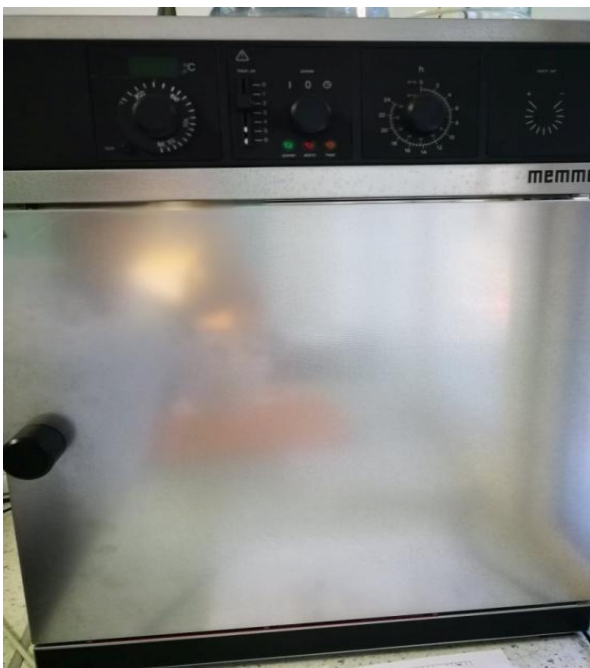


Figura 4: Pupinel (sterilizator Memmert)

B. Metode fizico-chimice:

1. Sterilizarea cu oxid de etilenă (ETO)

Oxidul de etilenă este un gaz incolor, toxic, alergizant, iritant și poate forma cu aerul un amestec exploziv, ceea ce permite utilizarea lui numai în condiții riguros controlate.

Bacteriile sunt omorâte prin acțiunea oxigenului din molecula oxidului de etilen (CH_2OCH_2). Oxidul de etilenă are acțiuni sterilizantă la temperaturi relativ scăzute ($20\text{-}60^\circ\text{C}$) și are putere penetrantă rapidă asupra diverselor materiale sintetice termoplastice.

Indicațiile sterilizării cu ETO: obiecte din material plastic, împachetate ermetic în pungi de plastic.

Având în vedere riscul toxic pentru personalul stației de sterilizare, pentru cei care manipulează sau pentru pacienții la care se utilizează obiectele sterilizate cu oxid de etilenă (ETO este absorbit de multe materiale, din acest motiv, după sterilizare, elementul trebuie să fie aerisit pentru a elimina ETO rezidual), această metodă trebuie utilizată doar atunci când nu există alte mijloace de sterilizare.

Utilizarea ETO este interzisă în următoarele cazuri:

- sterilizarea materialului medico-chirurgical a cărui compoziție nu este cunoscută sau în urgență,
- reesterilizarea echipamentului medical constituit din părți de policlorura de vinil sterilizat inițial cu radiații ionizante sau raze gamma,
- în încăperile unde se fumează (aceste încăperi trebuie ventilate în permanență direct cu aer proaspăt din exterior).

2. Sterilizarea cu plasmă cu gaz – utilizează ca agent de sterilizare în principal peroxidul de hidrogen. Reprezintă o tehnologie nouă de sterilizare care se utilizează pentru sterilizarea instrumentarului care nu suportă autoclavarea.

Plasma reprezintă o a patra stare de agregare a materiei, fiind constituită din ioni, electroni și particule neutre (atomi sau molecule), între care se manifestă interacțiuni electromagnetice și care la nivel microscopic este electric neutră. Poate fi considerată ca fiind un gaz total sau parțial ionizat, per ansamblu neutru din punct de vedere electric. Totuși, este considerată ca o stare de agregare distinctă, având proprietăți specifice. Temperatura plasmei obținute în laborator poate lua valori diferite pentru fiecare tip de particulă constituentă. De asemenea, aprinderea plasmei depinde de numeroși parametri (concentrație, câmp electric extern), fiind imposibilă stabilirea unei temperaturi la care are loc trecerea materiei din stare gazoasă în plasmă. Datorită sarcinilor electrice libere, plasma conduce curentul electric și este puternic influențată de prezența câmpurilor magnetice externe.

2.2. Pregătirea materialelor pentru sterilizare

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

a) Decontaminarea materialelor

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

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

Recomandări:

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

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

b) Uscarea

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

c) Asamblarea

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

d) Lubrefierea

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

e) Verificarea

Se verifică:

- dacă procesul de curățare a fost efectuat corect,
- integritatea instrumentarului,
- etanșeitatea și integritatea pieselor care au necesitat demontarea,
- casele și cutiile metalice pentru instrumentar, pentru a nu prezenta deformări, defecțiuni sau urme ale etichetărilor anterioare.

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

f) Împachetarea

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

Împachetarea se poate face în:

- *hârtie specială* pentru împachetarea instrumentarului sau a materialului textil (pentru sterilizarea cu abur sub presiune), obligatoriu în doua straturi, astfel încât materialul de sterilizat să fie bine închis, fără soluții de continuitate; după plierea celui de al doilea strat acesta se închide cu bandă adezivă cu indicator fizico-chimic de virare a culorii;
- *pungi / role hârtie plastic* fabricate special se utilizează pentru:
 - sterilizarea cu aer cald sau cu oxid de etilenă, având indicatori fizico-chimici de temperatură;
 - sterilizarea cu abur sub presiune, având indicatori fizico-chimici de temperatură.

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

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

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

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

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

2.3. Stocarea și menținerea sterilității materialelor după operațiunea de sterilizare

La extragerea materialului sterilizat din sterilizatorul cu abur sub presiune se verifică vizual integritatea pachetelor ambalate în hârtie specială sau în pungi hârtie plastic.

Se închide imediat colierul casoletelor și obturatoarele cutiilor pentru instrumentar, pentru a asigura protecția sterilității, astfel încât să se evite orice contaminare. Stocarea va trebui să îndeplinească anumite criterii:

- loc uscat rezervat acestei folosiri
- gestiunea rotației materialelor (primul intrat - primul ieșit)
- etanșeitarea containerelor cu sterile și conservarea integrității ambalajului.

Pentru menținerea sterilității materialelor, a instrumentarului și a dispozitivelor medicale care au fost supuse procesului de sterilizare, este necesar să se asigure păstrarea acestora în dulapuri închise și igienizate corespunzător. În aceste dulapuri este interzisă depozitarea sau păstrarea altor materiale. Pentru diminuarea riscului de contaminare a materialului steril, acesta va fi manipulat cât mai puțin și întreținut în perfectă stare de curățenie.

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

- *cutii metalice perforate sau casolete cu colier* - 24 de ore de la sterilizare, cu condiția menținerii cutiilor și a casoletelor închise.
- *materialele ambalate în pungi hârtie-plastic sudate* - 2 luni de la sterilizare, cu condiția menținerii integrității ambalajului (cu excepția celor pentru care producătorul specifică o altă perioadă de valabilitate, cu condiția menținerii condițiilor specificate de acesta).

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

2.4. Controlul sterilizării

Controlul sterilizării la autoclav se efectuează:

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

1. Testul de verificare a penetrării aburului

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

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

Pentru documentare se păstrează hârtia folosită pentru test la loc întunecos.

Registrele de evidență a testului Bowie & Dick și testele Bowie & Dick se păstrează pe fiecare secție unde se efectuează procedura de sterilizare la autoclav minimum 6 luni. Atât registrele, cât și testele sunt verificate periodic de către serviciul de supraveghere, prevenire și limitare a infecțiilor asociate asistenței medicale (SPIAAM). Orice neconformitate a testelor Bowie & Dick se anunță imediat.

2. Indicatori fizico-chimici

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

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

Se vor verifica indicatorii de eficiență ai sterilizării:

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

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

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

3. Indicatori biologici

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

- fiole de plastic termorezistent ce au în interior un strip impregnat cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) pentru sterilizarea la autoclav;
- fiole de plastic care au în interior un strip impregnat cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) pentru sterilizarea cu plasmă;
- strip impregnat cu *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™) (denumire veche *Bacillus subtilis*) pentru sterilizarea cu aer cald (etuvă, pupinel).

Efectuarea controlului bacteriologic al sterilizării la autoclav:

- se utilizează indicator biologic cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™). Acesta indică îndeplinirea tuturor condițiilor pentru efectuarea corectă a sterilizării (temperatură, presiune, timp). Un ciclu de sterilizare corect se efectuează la temperaturi de 121°-134° C.
- indicatorul biologic se introduce într-un ciclu normal de sterilizare, așezându-se în locul cel mai greu accesibil al autoclavului.
- la terminarea procesului de sterilizare fiola se lasă 10 minute să se răcească, pentru a evita riscul spargerii ei.

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

- se utilizează indicatori biologici impregnați cu *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™), preparați industrial, care conțin 106 UFC,
- se plasează cel puțin 2 indicatori biologici în fiecare șarjă verificată, cel puțin o dată pe săptămână; se realizează ciclul complet de sterilizare,

În cazul testelor pozitive se anunță imediat firma de service pentru revizia aparatului. Dacă revizia efectuată de personal tehnic specializat constată probleme tehnice în funcționarea aparatului sau indicatorii biologici sunt în mod repetat neconformi, etuva/pupinelul/autoclavul nu se mai utilizează până la remedierea problemelor tehnice.

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

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

3. Antiseptice și dezinfectante

3.1. Definiții

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

Curățarea - etapă preliminară obligatorie, permanentă și sistematică în cadrul oricărei activități sau proceduri de îndepărtare a murdăriei (materie organică și anorganică) de pe suprafețe (inclusiv tegumente) sau obiecte, prin operațiuni mecanice sau manuale, utilizându-se agenți fizici și/sau chimici, care se efectuează în unitățile sanitare de orice tip, astfel încât activitatea medicală să se desfășoare în condiții optime de securitate;

De regulă este urmată de dezinfecție sau dezinfecție și sterilizare

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

În raport de acțiunea substanței dezinfectante, dezinfecția poate fi:

- **dezinfecție de nivel înalt** - realizează distrugerea bacteriilor în forma vegetativă, a fungilor, a virusurilor, a micobacteriilor și a majorității sporilor bacterieni; această formă de dezinfecție se poate aplica și dispozitivelor medicale reutilizabile, destinate manevrelor invazive, și care nu suportă autoclavarea;
- **dezinfecție de nivel intermediar (mediu)** - realizează distrugerea bacteriilor în formă vegetativă, a fungilor, a micobacteriilor și a virusurilor, fără acțiune asupra sporilor bacterieni;
- **dezinfecție de nivel scăzut** - realizează distrugerea majorității bacteriilor în forma vegetativă, a unor fungi și a unor virusuri, fără acțiune asupra micobacteriilor, sporilor de orice tip, virusurilor neanvelopate și a mușchiurilor.

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

- **antiseptice** – utilizate pentru țesuturi vii (tegumente, mucoase, plăgi), ele fiind mai puțin toxice pentru organismul uman;
- **dezinfectante** – substanțe puternic bactericide la concentrații relativ scăzute, dar datorită efectului toxic sau iritant asupra țesuturilor umane, se utilizează doar pentru obiecte și suprafețe. Uneori, aceeași substanță (ex. Cloramina B) poate fi antiseptic sau dezinfectant, în funcție de concentrația utilizată.

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

Sterilizarea - operațiunea prin care sunt distruse toate microorganismele inclusiv sporii bacterieni (în funcție de metoda de sterilizare utilizată) de pe obiectele contaminate, rezultatul acestei operațiuni fiind starea de sterilitate.

3.2. Curățarea

Pentru curățare se utilizează numai măturatul sau periatul umed (manual sau automat). Nu se recomandă măturatul uscat sau scuturatul în încăperi, locuri circulare sau aglomerate.

Curățarea se realizează cu ustensile, materiale de întreținere și produse de curățenie, respectându-se următoarele reguli:

- se aplică instrucțiunile și recomandările producătorului, cu respectarea concentrației, timpului de contact și a duratei de utilizare a soluțiilor;
- se utilizează în ambalajul original;
- dacă produsele dezinfectante nu se utilizează ca atare, ele necesită diluții, soluția se face în cantitatea necesară și se utilizează imediat; soluțiile se prepară cu ajutorul unui sistem de dozare gradat;
- dacă soluția nu se folosește imediat, recipientul se etichetează cu: denumire, concentrația de utilizare, data preparării și data expirării;
- este interzis amestecul mai multor produse;
- se poartă obligatoriu echipamentul de protecție și se aplică normele specifice de protecție a muncii;
- personalul care utilizează în mod curent substanțele de curățare / dezinfecție trebuie instruit cu privire la noile proceduri sau la noile produse.

Pentru toate suprafețele (paviment, pereți, mobilier, ferestre, uși, calorifere, obiecte sanitare etc.) se vor respecta următoarele etape:

- curățare
- spălare cu apă caldă și detergent-dezinfectant
- clătire.

Se recomandă ca operațiunile de curățenie să înceapă cu încăperile sau zonele mai puțin contaminate. În fiecare încăpere se începe cu curățarea obiectelor mai puțin murdare și se termină cu obiectele murdare (coșul de gunoi și vasul de toaletă).

3.3. Dezinfecția

Dezinfecția este procedura care se aplică numai după curățare și este urmată de clătire, după caz. Excepția este reprezentată de situația în care suportul care trebuie tratat a fost contaminat cu produse biologice. În aceasta situație prima etapă este de dezinfecție, apoi se realizează curățarea urmată de încă o etapă de dezinfecție și clătire, după caz.

În orice activitate de dezinfecție se aplică măsurile de protecție a muncii, conform prevederilor legislației în vigoare, pentru a preveni accidentele și intoxicațiile.

- **Dezinfecția prin căldură uscată sau flambarea** este utilizată exclusiv în laboratorul de microbiologie (pentru flambarea anselor de nichel-crom sau a gâtului flacoanelor de sticlă).
- **Dezinfecția prin căldură umedă** se utilizează numai în cazul spălării automatizate a lenjeriei și a veselei, cu condiția atingerii unei temperaturi de peste 90 grade C.

- **Dezinfecția cu raze ultraviolete** este indicată în dezinfecția suprafețelor netede și a aerului în boxe de laborator, săli de operații, alte spații închise, pentru completarea măsurilor de curățare și dezinfecție chimică.

Aparatele de dezinfecție cu raze ultraviolete, autorizate conform prevederilor legale în vigoare, sunt însoțite de documentația tehnică, ce cuprinde toate datele privind caracteristicile și modul de utilizare și de întreținere al aparatelor, pentru a asigura o acțiune eficientă și lipsită de nocivitate. Se va întocmi evidența orelor de funcționare pentru lămpile de ultraviolete.

- **Dezinfecția prin mijloace chimice** se realizează prin utilizarea produselor biocide.

Produsele biocide utilizate pentru dezinfecție în unitățile sanitare se încadrează în grupa principală I, tip de produs 1 și 2, conform prevederilor Regulamentului UE.

Produsele biocide tipul 1 sunt utilizate pentru:

- dezinfecția igienică a mâinilor;
- dezinfecția pielii intacte.

Produsele biocide tipul 2 sunt utilizate pentru:

- dezinfecția suprafețelor;
- dezinfecția manuală a dispozitivelor medicale, dezinfecția prin imersie, dezinfecția la mașini automate;
- dezinfecția lenjeriei / material moale.

În unitățile sanitare, în afara produselor tip 1 și 2, se mai utilizează și produse biocide tip 4, 14 și 18 (menținerea igienei în zona de distribuție și preparare a alimentelor sau cele utilizate în activitățile de deratizare și pentru acțiunile de dezinsecție).

În funcție de eficacitate, de timpul de contact și de concentrația utilizată, nivelurile de dezinfecție sunt:

- *dezinfecție de nivel înalt;*
- *dezinfecție de nivel intermediar;*
- *dezinfecție de nivel scăzut.*

Este obligatorie respectarea concentrațiilor și a timpului de contact specificate în avizul produsului.

Etapile dezinfecției de tip înalt aplicate instrumentarului care nu suportă autoclavarea sunt:

- dezinfecție, cel puțin de nivel mediu;
- curățare;
- dezinfecție de tip înalt prin imersie;
- clătire cu apă sterilă.

Soluția chimică utilizată pentru dezinfecția înaltă se va folosi maximum 48 de ore sau 30 de cicluri de la preparare, cu condiția menținerii în cuve cu capac.

În cazul soluțiilor pentru care producătorul indică mai mult de 30 de cicluri de dezinfecție sau un termen de valabilitate mai mare de 48 de ore, după expirarea termenelor de valabilitate, este obligatorie testarea concentrației soluției cu benzi indicatoare speciale la începutul fiecărei proceduri.

Procedurile de dezinfecție înaltă sunt înregistrate în *Registrul de dezinfecție înaltă*.

Criteriile de alegere corectă a dezinfectantelor sunt următoarele:

- spectrul de activitate adaptat obiectivelor fixate;
- timpul de acțiune;
- în funcție de secția în care sunt utilizate, dezinfectantele trebuie să aibă eficiență și în prezența substanțelor interferente: sânge, puroi, vomă, diaree, apă dură, materii organice;
- să aibă remanență cât mai mare pe suprafețe;
- să fie compatibile cu materialele pe care se vor utiliza;
- gradul de periculozitate (foarte toxic, toxic, nociv, coroziv, iritant, oxidant, foarte inflamabil și inflamabil) pentru personal și pacienți;
- să fie ușor de utilizat;
- să fie stabile în timp;
- natura suportului care urmează să fie tratat;
- riscul de a fi inactivat de diferite substanțe sau condiții de mediu, așa cum este prevăzut în fișa tehnică produsului;
- să fie biodegradabile în acord cu cerințele de mediu.

Tabelul nr. 1: Clasificarea și proprietățile unor substanțe dezinfectante (după C H. Collins și colab., 1989)

Substanțe	Activă față de					Inactivate de				Toxicitate		
	Fungi	Bacterii		Mico-bacterii	Spori	Proteine	Alte substanțe organice	Apă dură	Detergenți	Piele	Ochi	Căi respiratorii
		G +	G-									
Fenoli	+++	+++	+++	++	-	+	++	+	C	+	+	-
Hipocloriți	+	+++	+++	++	++	+++	+	+	C	+	+	+
Alcooli	-	+++	+++	+++	+++	+++*	+	+	+	-	+	+
Formaldehidă	+++	+++	+++	+++	+++*	+	+	+	-	+	+	+
Glutaraldehidă	+++	+++	+++	++	+++**	NP	+	+	-	+	+	+
Iodofori	+++	+++	+++	++	+	+++	+	+	A	+	+	-
Compuși cuaternari de amoniu	+	+++	++	-	-	+++	+++	+++	A	+	+	-

* = peste +0°C

NP = neprecizat

** = peste 20°C

G = Gram

+++ = bun

C = cationic

++ = mediu

A = anionic



Figura 5: flacoane cu diverse dezinfectante: a. HMI Scrub NP – Antiseptic igienic, chirurgical prin frecare, b. Anios Oxy'Floor – dezinfectant detergent de nivel înalt pentru suprafețe, c. Desderman Pure Gel – soluție cu alcool pentru dezinfecția igienică și chirurgicală a mâinilor

Reguli generale de practică ale dezinfecției:

- dezinfecția completează curățarea, dar nu o suplinește și nu poate înlocui sterilizarea sau dezinfecția de tip înalt în cazul dispozitivelor termosensibile;
- pentru dezinfecția în focar se utilizează dezinfectante cu acțiune asupra agentului patogen incriminat sau presupus;
- utilizarea dezinfectantelor se face respectându-se normele de protecție a muncii, care să prevină accidentele și intoxicațiile;
- personalul care utilizează în mod curent dezinfectantele trebuie instruit cu privire la noile proceduri sau la noile produse dezinfectante;
- în fiecare încăpere în care se efectuează operațiuni de curățare și dezinfecție trebuie să existe în mod obligatoriu un grafic zilnic orar, în care personalul responsabil va înregistra tipul operațiunii, ora de efectuare și semnătura;
- personalul trebuie să cunoască denumirea dezinfectantului, data preparării, concentrația soluției de lucru, precum și timpul de acțiune.

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

Suprafețele, instrumentarul și echipamentele sunt clasificate după cum urmează:

- **Critice** - cele care vin în contact cu țesuturile corpului uman sau penetrează țesuturile, inclusiv sistemul vascular, în mod normal sterile. Aceste dispozitive trebuie sterilizate.
 - Exemple: instrumentarul chirurgical, inclusiv instrumentarul stomatologic, materialul utilizat pentru suturi, echipamentul personalului din sălile de operații, câmpuri operatorii, mesele și tampoanele, tuburile de dren, implanturile, acele și seringile, cateterele cardiace și urinare, toate dispozitivele intravasculare, endoscoapele flexibile sau rigide utilizate în proceduri invazive, echipamentul pentru biopsie asociat endoscoapelor, acele utilizate în neurologie;

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

- Exemple: endoscoapele flexibile și rigide utilizate exclusiv ca dispozitive pentru imagistica, laringoscoapele, tuburile endotraheale, echipamentul de anestezie și respirație asistată, diafragmele, termometrele de sticlă, termometrele electronice, ventuzele, vârfurile de la seringile auriculare, specul nazal, specul vaginal, instrumentele utilizate pentru montarea dispozitivelor anticoncepționale; suprafețele inerte din secții și laboratoare, stropite cu sânge, fecale sau cu alte secreții și/sau excreții potențial patogene.

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

- Exemple: stetoscoape, ploști, urinare, manșeta de la tensiometru, specul auricular, cadrele pentru invalizi, suprafețele dispozitivelor medicale care sunt atinse și de personalul medical în timpul procedurii, orice alte tipuri de suporturi.

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

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

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

3.3.1. Dezinfectia aerului

Se utilizează:

- a) **mijloace fizice** – lămpi cu radiații UV – nepenetrante - se utilizează ca un mijloc de completare a măsurilor de curățenie și dezinfectie, având o acțiune limitată.
- b) **mijloace chimice** - aplicarea dezinfectantelor se va face prin aerosolizare (nebulizare), conform indicațiilor producătorului.

3.3.2. Dezinfectia mâinilor

Spălarea mâinilor face parte din **Precauțiile Standard** și se aplică pentru tot personalul medico-sanitar, administrativ, pacienți, vizitatori, studenți, elevi, voluntari în vederea diminuării riscului de apariție a infecțiilor asociate asistenței medicale.

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

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

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

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

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

Tabelul nr. 2: Tipuri de proceduri și indicații pentru dezinfectia mâinilor

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

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

OMS recomandă curățirea mâinilor personalului medical în următoarele circumstanțe:

1. înainte de a atinge pacientul,
2. înaintea procedurilor curate/aseptice,
3. după expunerea la fluide ale pacientului,
4. după atingerea pacientului,
5. după atingerea suprafețelor adiacente pacientului. (Fig. 6)

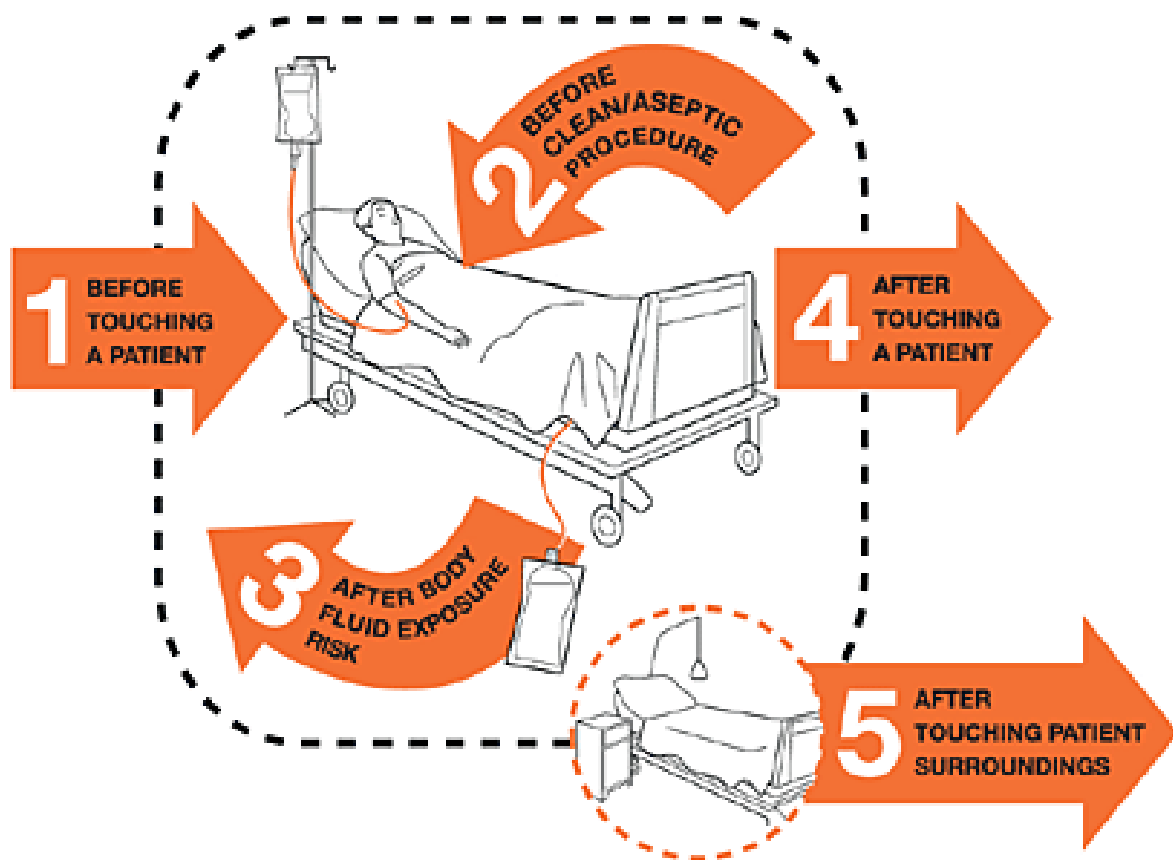


Figura 6: Cele 5 momente ale igienei mâinilor
(<http://www.who.int/gpsc/5may/background/5moments/en/>)

4. Medii de cultură

Majoritatea bacteriilor și ciupercilor pot fi cultivate în laborator pe medii inerte, acelulare, iar restul microorganismelor, cum sunt bacteriile cu habitat obligatoriu intracelular (rickettsii, chlamydii) și virusurile, pe culturi de celule, ouă embrionate și animale de experiență.

Cunoașterea necesităților nutritive ale bacteriilor este foarte importantă în bacteriologie, deoarece stă la baza preparării mediilor de cultură destinate izolării și cultivării microorganismelor în laborator fie în scop diagnostic, fie în scop productiv. S-au realizat medii adecvate pentru aproape toate bacteriile de interes medical, speciile bacteriene necultivabile fiind foarte puține, ca, de pildă, *Mycobacterium leprae* și unele spirochete printre care *Treponema pallidum*.

Mediile de cultură sunt amestecuri de substraturi nutritive, folosite pentru menținerea viabilității, creșterii și multiplicării microorganismelor în condiții artificiale. Utilizarea mediilor de cultură permite izolarea microorganismelor în cultură pură, facilitând astfel identificarea lor. Se folosesc de asemenea pentru testarea sensibilității microorganismelor la chimioterapicele antiinfecțioase permițând alegerea unei medicații țintite, în industria farmaceutică pentru producerea unor preparate (vaccinuri și la alte produse biologice) și pentru controlul încărcăturii microbiene a suprafețelor, aerului, alimentelor, apei etc.

Mediile de cultură trebuie să îndeplinească anumite **condiții**:

- în primul rând să fie sterile,
- să asigure substanțele nutritive necesare creșterii și multiplicării microbilor (apă, sursă de carbon și azot, factori de creștere, vitamine, minerale),
- să aibă un pH optim; cei mai mulți germeni se dezvoltă la un pH de 7,2-7,4 dar sunt și excepții ca, de pildă, germenii din genul *Brucella* care se dezvoltă la un pH de 6,8 sau vibriionul holeric la un pH de 9,
- să fie clare pentru a permite sesizarea oricărei modificări produse de microbi în mediul de cultură,
- să asigure condiții de aerobioză sau anaerobioză

4.1. Compoziția mediilor de cultură

În scop diagnostic sau productiv, mediile de cultură se prepară dintr-o serie de substraturi biologice, mai mult sau mai puțin bine definite chimic și care se regăsesc în aproape toate mediile de cultură.

În cercetare, când se studiază performanțele metabolice ale bacteriilor, sunt necesare medii cu o compoziție foarte riguros definită. Aceste medii se prepară din fiecare substanță în parte și se numesc medii sintetice.

Substraturile biologice întâlnite la majoritatea mediilor sunt peptonele, extractul de carne, extractul de drojdie, la care se adaugă unele substanțe cum sunt clorura de sodiu, mono și/sau polizaharide, vitamine etc.

Peptonele sunt amestecuri de substanțe care se obțin prin hidroliza enzimatică sau acidă a proteinelor de origine animală (de exemplu, făină de oase). Ele nu au o compoziție chimică

foarte bine definită dar, prin conținutul în peptide și aminoacizi, constituie o sursă universală de azot, pentru toate bacteriile cultivabile. Ele sunt folosite practic în prepararea tuturor mediilor de cultură. Rețetele de preparare a peptonelor sunt secrete de firmă (Peptonă Difco, Merck Oxoid etc.);

Extractul de carne se obține prin deshidratarea decoctului de carne de vită. Acesta conține cantități importante de creatină, xantină, hipoxantină, acid uric, acid adenilic, glicocol, uree, glutamină ca sursă de azot, precum și glicogen, hexozofosfați, acid lactic ca sursă de carbon etc. Se poate prepara în orice laborator.

Extractul de drojdie se obține prin cultivarea controlată a drojdiilor și conține numeroase vitamine, mai ales cele din grupul B.

Clorura de sodiu se adaugă la toate mediile uzuale într-o concentrație de 0,9%. Pentru cultivarea bacteriilor halofile (care cresc la o osmolaritate mare) concentrația poate crește până la 10%.

Mono sau polizaharidele, unii alcooli (glicerină, manitol) îmbogățesc mediile deoarece constituie surse de carbon ușor accesibile multor bacterii.

Uneori se mai adaugă la medii indicatori colorimetrici de pH, agenți selectivi etc.

O importanță deosebită în prepararea mediilor solide îl au agenți de solidificare care sunt agar-agarul și gelatina. Gelatina se folosește destul de rar deoarece, pe de o parte, unele bacterii o hidrolizează, iar pe de altă parte se lichefiază la 37°C, temperatură la care se dezvoltă majoritatea bacteriilor de interes medical.

4.2. Clasificarea mediilor de cultură

Mediile se clasifică după diverse criterii, dintre care noi ne vom referi la starea fizică, complexitatea și scopul în care sunt utilizate.

În funcție de proveniență, mediile sunt *naturale* (bulionul, mediul Tarozzi cu albuș de ou, Loeffler cu ser de bou și ou), și *sintetice* sau *artificiale* (mediul Thayer-Martin, MacConkey).

În funcție de starea fizică, mediile sunt *lichide* (bulion, apa peptonată), *semisolide* (gelificate cu 5% agar) și *solide*.

Mediile lichide. Bacteriile au fost cultivate inițial pe medii lichide, cele solide fiind necunoscute la începutul dezvoltării microbiologiei.

În laboratorul de microbiologie medicală, mediile lichide au o largă utilizare. Astfel, unele produse biologice, cum este sângele destinat hemoculturii, se însămânțează pe medii lichide. De asemenea, tulpinile microbiene izolate în culturi pure sunt supuse, în vederea identificării, unor teste biochimice. Majoritatea acestora se efectuează pe medii lichide (fermentarea de zaharuri).

Mediile lichide oferă, fără îndoială, condițiile cele mai bune de creștere și multiplicare a bacteriilor, dar ele nu se pot utiliza, în general, la izolarea unui microb dintr-un produs biologic care nu este în mod natural steril decât dacă se adaugă la mediu un agent selectiv.

În laboratoarele de microbiologie industrială, al căror scop este obținerea unor produși ai metabolismului microbial (toxine, antibiotice, vitamine, alcooli, hormoni), imposibil sau foarte costisitor de obținut pe cale sintetică, cultivarea se face pe medii lichide. Rezultatul este o masă microbială mare, într-un timp foarte scurt. Cel mai simplu și utilizat mediu de cultură lichid este bulionul.

Bulionul se obține din decoct de carne la care se adaugă peptonă și NaCl (decoct de carne + 1% peptonă + 0,5% NaCl).

Bulionul stă la baza preparării multor medii de cultură lichide:

- **bulion Mueller-Hinton, bulion-sânge, bulion selenit, bulion tioglicolat, bulion cu infuzie de cord-creier etc.**

Mediile pentru cultivarea bacteriilor din sânge (hemocultura) au toate în componența lor bulionul, la care este adăugat: tioglicolat, infuzia de cord creier, factorii X și V, vit. B6, K3, factori care previn coagularea sângelui și efectul bactericid al serului etc., în funcție de germenii izolați (aerobi, anaerobi, microaerofili, fungi).

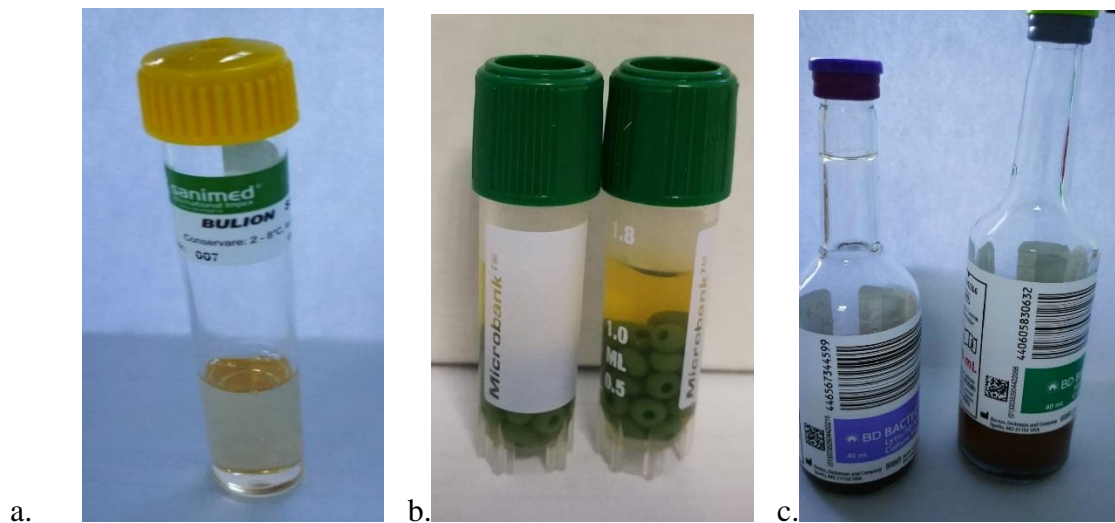


Figura 7: Medii lichide. a .Mediu lichid simplu - Bulion, b. Mediu lichid de stocare - Microbank™, c. Mediu lichid - flacoane BD BACTEC

Mediile solide se obțin din medii lichide gelificate cu agar-agar (1,5-2%). Agar-agarul este un gel extras dintr-o algă marină roșie, cu originea în estul Asiei. Din punct de vedere chimic este un polimer al unui ester sulfuric al galactozei. După purificare este inodor, incolor, fără gust și netoxic pentru microorganisme. Este insolubil în apă rece dar solubil în apă la temperatura de fierbere. După răcire produce gelificarea mediului în concentrație de 0,5-1%. Agar-agarul se poate retopi la temperaturi între 80-100°C.

Agarul nu are valoare nutritivă și spre deosebire de gelatină nu este atacat enzimatic de bacterii decât în cazuri cu totul deosebite.

Mediile de cultură solide se pot utiliza în plăci Petri, în tuburi (coloană înclinată sau coloană dreaptă) sau pe dispozitive din plastic (introduse în tuburi transparente).

Cultivarea bacteriilor pe medii solide a constituit un pas hotărâtor în dezvoltarea microbiologiei în general și a diagnosticului bacteriologic în special. Avantajul cultivării pe medii solide constă în faptul că microbii nu se dezvoltă în amestec ci în colonii izolate dacă sunt însămânțați printr-o tehnică corespunzătoare. Tehnicile de însămânțare în vederea obținerii coloniilor izolate permit cultivarea microbilor în cultură pură.

Colonia microbială este o entitate macroscopică (vizibilă deci cu ochiul liber) care rezultă din înmulțirea unui singur microb.

Caracterele culturale au o importanță deosebită în identificarea microbilor. Ele dau informații despre forma, dimensiunea, consistența, activitatea hemolitică și unele modificări pe care microbiile le produc în mediul respectiv. De asemenea, cultivarea pe medii solide dă posibilitatea de numărare a germenilor microbieni dintr-un produs biologic, aspect important, mai ales atunci când criteriul de implicație etiologică este cel numeric (de pildă în infecții urinare). Cel mai simplu mediu solid este geloza.

Geloza simplă. Geloza se prepară din bulion la care se adaugă agar-agar (1000 ml bulion încălzit + 25-30 g agar-agar).

O multitudine de medii solide au la bază geloza (agarul):

- Mueller-Hinton, Chapman, Thayer-Martin, AABTL (agar-albastru de brom thimol, lactoză), ADCL (agar-desoxycholat-citrat lactoză), Mac Conkey, Hektoen, Sabouraud, Schaedler etc.

Mediile semisolide sunt medii cu 0,2 – 0,5 % agar-agar. Se utilizează pentru menținerea viabilității germenilor, studierea activității biochimice sau a mobilității bacteriilor:

- **Cary-Blair** (mediu de transport pentru bacterii gram-negative aerobe și facultativ anaerobe și anaerobe), **Stuart** (mediu de transport pentru microorganisme pretențioase), **mediu politrop MIU** (pentru evidențierea mobilității, producerea de indol și urează la enterobacterii) etc.

După complexitate distingem **medii simple** și **medii îmbogățite**. Ele pot fi lichide și solide.

Medii simple cum sunt **bulionul simplu** sau **geloza simplă** sunt medii uzuale, pe care se dezvoltă majoritatea microorganismelor, având în compoziție extract de carne, peptonă și clorură de sodiu. **Apa peptonată** (apă + 1% peptonă + 0,5% NaCl) este mediu de îmbogățire pentru vibrioni.

Necesarul de substanțe nutritive este foarte diferit de la o specie bacteriană la alta. Astfel, există bacterii ca, de pildă, cele din familia *Enterobacteriaceae*, cu pretenții foarte reduse și care cultivă foarte bine pe geloză simplă și altele care au nevoie de substanțe ca: primidine, purine, aminoacizi, factori de creștere etc., deoarece nu sunt capabile să le sintetizeze ele însele.

Cel mai utilizat mediu de cultură îmbogățit este **geloza sânge 5%** care se prepară prin adăugarea a 5 ml de sânge la agarul topit și răcit la 45°C. Mai frecvent se utilizează sânge de oaie sau sânge de cal și mai rar sânge de iepure sau alt animal. Pe geloză sânge se observă dacă bacteriile însămânțate au sau nu activitate hemolitică. Menționăm însă că atât activitatea hemolitică precum și caracterele culturale diferă în funcție de specia animală de la care provine sângele.

Este contraindicată prepararea gelozei sânge cu sânge de om, procedeu practicat din păcate de unele laboratoare din lipsă de sânge de oaie. Sângele uman conține o serie de substanțe antibacteriene care împiedică dezvoltarea corespunzătoare a germenilor.

Geloza ciocolată se obține prin adăugarea a 10% sânge de oaie în geloza simplă încălzită la 60-80°C.

Mediile de cultură mai pot fi îmbogățite prin adăugarea de zaharuri, ascită, selenit, tioglicolat (**bulion glucozat**, **bulion ascită**, **bulion selenit**, **bulion tioglicolat**, **geloză ascită**), ser (**bulion**

ser - mediul Loffler pentru *Corynebacterium*) extract de drojdie, ou, carne sau ficat (mediipentru anaerobi),factori de creștere X sau/si V (pentru *Haemophilus*) etc.

După scopul în care se utilizează, mediile de cultură sunt: *de transport*, *selective*, *diferențiale* și *speciale*.

Mediile *de transport* asigură condiții optime pentru menținerea viabilității microorganismelor, din momentul recoltării până la însămânțare, atunci când aceste etape se realizează în locații diferite. Ca exemple, mediile:

- *Stuart și Amies* (pentru izolarea germenilor din secreții nazo-faringiene, urogenitale și din plăgi), *Cary Blair* (pentru izolarea enterobacteriilor din materii fecale), *apa peptonată alcalină* (pentru germeni nepretențioși), *Mycoline* (pentru fungi), *Portagerm* (menține viabilitatea aerobilor și anaerobilor și fungilor 24-48 h la 20-25°C) etc.

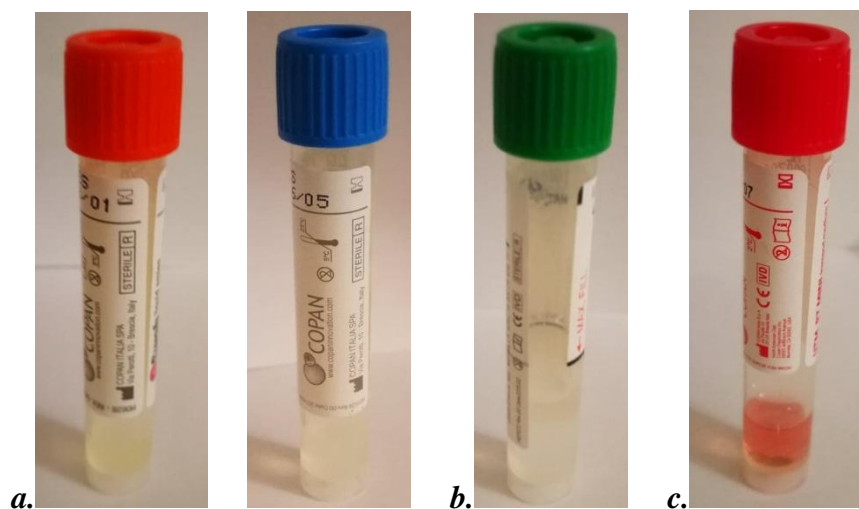


Figura 8: Exemple de medii de transport; Sistemul de colectare și transport ESwab™: a. Sisteme de recoltare și transport (mediu Amies lichid) multifuncțional, b. Sistem de recoltare și transport (mediu Carry Blair), c. UTM (mediu universal de transport)

Mediile *selective* sunt acele medii care favorizează înmulțirea unei specii bacteriene în defavoarea altor specii. Mediile selective lichide se numesc *medii de îmbogățire*. Aceste medii se utilizează atunci când un produs biologic este polimicrobian și se urmărește izolarea primară a unei singure specii sau chiar mai multor specii în cultură pură. Dacă se însămânțează un asemenea produs, speciile care se multiplică mai repede vor concura nutritiv speciile cu dezvoltare mai lentă pe care le vor înlătura și prin produșii toxici de metabolism.

Cunoscând particularitățile metabolice ale speciilor de izolat se poate favoriza orice specie dintr-un amestec de microbi în așa fel încât să se multiplice satisfăcător. Astfel se poate interveni prin factori de selecție chimici, prin modificarea pH-ului, a presiunii osmotice, a temperaturii de cultivare etc.

Medii de îmbogățire prin inhibitori chimici sunt, de pildă, *bulionul cu tetratonat (Mueller-Kauffman)* sau cu selenit acid de sodiu în care se dezvoltă preferențial salmonelele. Materiile fecale se însămânțează pentru izolarea vibrionului holerice pe *apă peptonată*, factorul de inhibiție fiind pH-ul de 9, pH la care restul florei nu se multiplică. Izolarea listeriilor se face la +4°C, temperatură la care creșterea majorității microbilor este oprită. Stafilococii se izolează pe medii hiperosmolare ce conțin 12% NaCl. Un mediu obișnuit conține 0,9% NaCl.

Pentru mediile selective solide criteriile de inhibiție sunt aceleași. Ca inhibitori chimici se utilizează tot mai frecvent antibioticele ținând cont de rezistența naturală a diverselor specii microbiene. Atunci când vrem să izolăm un microb, vom adăuga la compoziția mediului unul, sau mai multe antibiotice și/sau sulfamide la care microbul respectiv este în mod natural rezistent (bacitracină, colistin, vancomicină, novobiocină, gentamicină, cloramfenicol, cefsulodin, cicloserină, cefoxitin, nistatin, amfotericină etc.). De exemplu, dacă vrem să izolăm bacterii anaerobe gram negative adăugăm la mediu vancomicină la care bacteriile gram pozitive anaerobe sunt sensibile.

Alți agenții selectivi care intră în compoziția mediilor de cultură pot fi amintiți:

- coloranți (cristal violet, albastru de metilen, eozină, verde briliant), derivați de bilă (săruri biliare, bilă uscată, dezoxicolat de Na), săruri anorganice (citrat de Na, azid de Na, citrat de Bi, tiosulfat de Fe),

În funcție de puterea de selecție, aceste medii pot fi:

- înalt selective: **Wilson-Blair** (pentru izolarea *Salmonella* sp. – agent inhibitor verde briliant), **Lowenstein-Jensen** (pentru izolarea *Mycobacterium tuberculosis*, conține verde malachit care inhibă flora de asociație), **Thayer-Martin** (pentru izolarea gonococilor și meningococilor, conține antibiotice și antimicotice care inhibă flora de asociație din secrețiile uro-genitale),
- moderat selective: **ADCL**, **Istrati-Meiert** (pentru izolarea enterobacteriilor, inhibă flora de asociație prin săruri biliare și verde briliant), **SS** (pentru izolarea *Salmonella* sp., *Shigella* sp.), **XLD**, **Hectoen** etc.,
- slab selective: **MacConkey** și **EMB (Levin)** (pentru izolarea enterobacteriilor).

Mediile de îmbogățire și selective sunt utilizate în scopul izolării primare, deci direct din probele recoltate.

Alte medii de îmbogățire și selective utilizate în laboratorul de microbiologie:

- mediul hiperclorurat **Chapman** (pentru izolarea stafilococilor),
- **bulion Pike (bulion glucozat cu cristal violet și azid de sodiu)** – mediu de îmbogățire pentru streptococi (necesita supliment sânge defibrinat),
- **bulion Todd-Hewitt** – mediu utilizat pentru cultivarea streptococilor beta hemolitici,
- **agar Thayer-Martin** mediu selectiv pentru detecția speciilor de *Neisseria*,
- mediul **OCST** (ou, cistina, ser, telurit de potasiu) pentru bacil difteric,
- **bullion / agar Schaedler** – mediu pentru cultivarea bacteriilor anaerobe,
- **bulion Brucella**, **mediul Preston** sau **mediul Park-Sanders** medii de îmbogățire pentru izolarea *Campylobacter* sp.
- **Pylori agar** sau alte medii selective pentru izolarea *Helicobacter pylori*: **Wilkins Chalgren** (suplimentat cu sânge uman 10% și adaos de antibiotice și amphotericină) sau **mediul Marshal** (cu infuzie de cord-creier, adaos de sânge de cal și o asociație de antibiotice și amphotericină);
- **Clostridium difficile agar** – mediu selectiv pentru anaerobi,
- **agar Sabouraud cu adaos de cloramfenicol / gentamicină / cicloheximidină** mediu selectiv pentru izolarea levurilor, fungilor filamentoși și dermatofitelor.

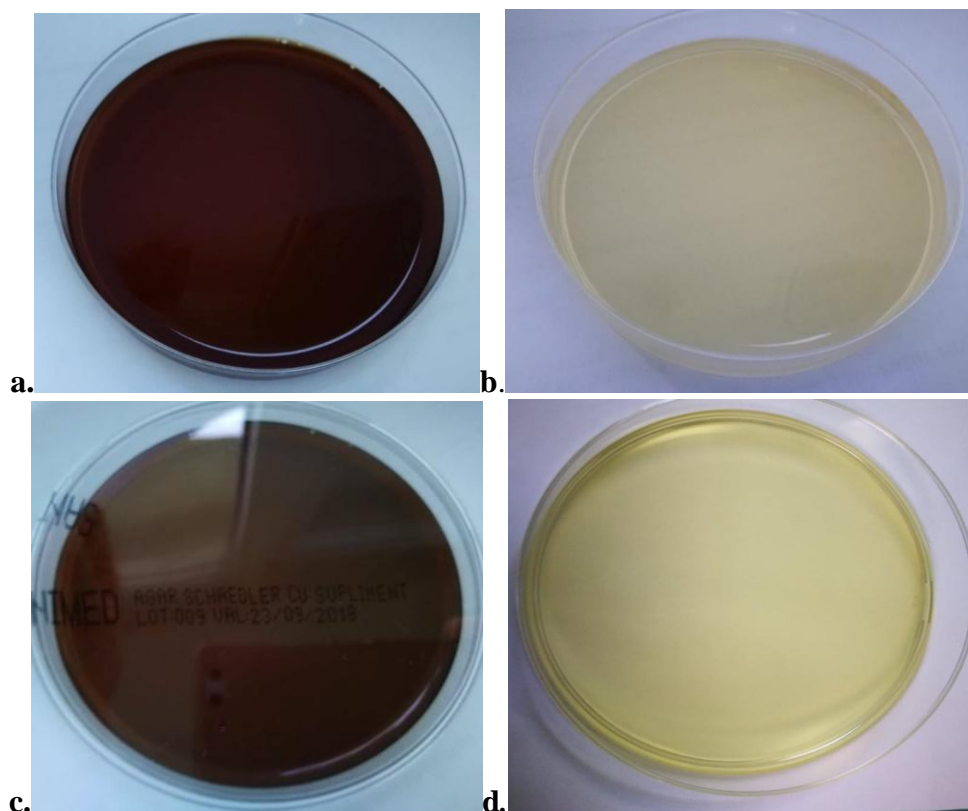


Figura 9: Medii selective: a. Mediu solid selectiv – SS, b. Mediu solid selectiv - Sabouraud cu cloramfenicol, c. Mediu solid selectiv - agar Schaedler, d. Mediu solid selectiv - Mueller Hinton cu supliment

Mediile cromogene sunt medii selective, ce conțin substraturi artificiale (cromogene) care după ce sunt hidrolizate de enzimele bacteriene produc compuși colorați. Primul mediu cromogen utilizat la identificarea *E. coli* din urină a fost **Color Plates 6-5E**. În prezent există pe piață o varietate de medii cromogene care pot identifica pe lângă enterobacterii (*E. coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp.), *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, stafilococi și *Candida* sp.

Astfel de medii sunt: **CPS** (permite izolarea enterobacteriilor, *Pseudomonas* sp., enterococi, stafilococi), **CHROMagar** (gamă largă de medii pentru izolarea și diferențierea speciilor de *Candida* sp., enterobacterii, vibrioni, stafilococi etc.), **Rainbow UTI** și **Chromogenic UTI** (pentru izolarea uropatogenilor).

O serie de medii cromogene cu necesități speciale se utilizează în practica de laborator pentru izolarea tulpinilor cu potențial nosocomial de tipul:

- chrom ID MRSA- pentru detecția *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent),
- chrom ID ESBL – pentru screening-ul tulpinilor secretoare de beta-lactamaze cu spectru extins,
- chrom ID VRE – pentru screening-ul tulpinilor de *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium* rezistente la vancomicină,
- chromatic CRE pentru detecția bacteriilor rezistente la carbapeneme.

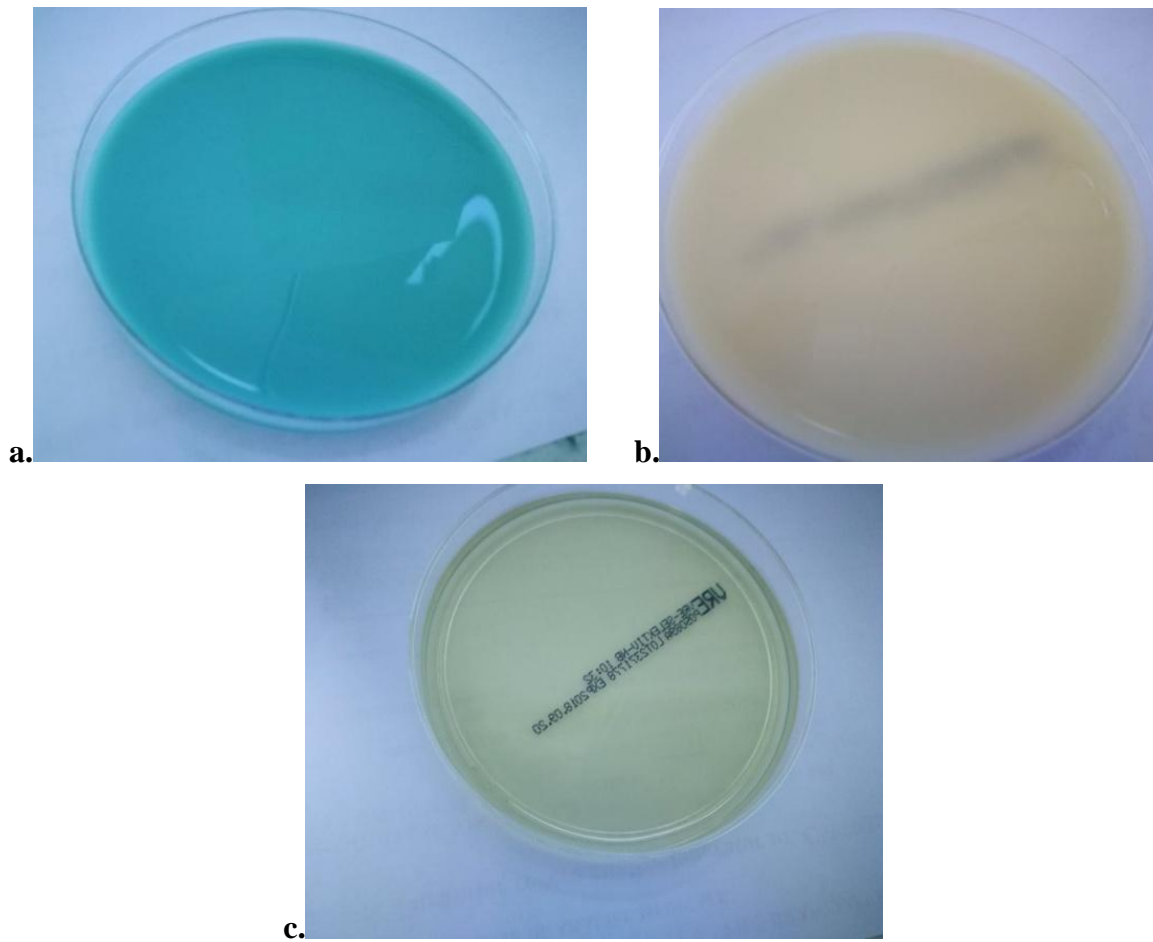


Figura 10: Medii speciale: a. Mediu solid cromogen - Brilliance CRE, b. Mediu solid cromogen - Brilliance MRSA, c. Mediu solid cromogen - Brilliance VRE

Mediile diferențiale conțin substraturi pentru anumite enzime sau citotoxine bacteriene și sisteme indicatoare ce conferă coloniilor particularități distinctive ușor de recunoscut. Astfel pe baza unor caractere de metabolism sau de patogenitate aceste medii permit diferențierea unor specii în cadrul aceluiași gen sau chiar între genuri diferite.

Astfel geloza sânge este un mediu care diferențiază bacteriile hemolitice de cele nehemolitice:

- pentru studierea **proprietăților hemolitice**, în scop diagnostic se folosește **geloza sânge 5%**, în vederea evidențierii producerii de hemolizine:
 - **α -hemolizina**: hemoliza de culoare verzuie din jurul coloniilor datorită degradării parțiale a hematiilor (*Streptococcus pneumoniae*, streptococi viridans),
 - **β -hemolizina**: zona clară de hemoliză în jurul coloniilor, datorită lizei complete a hematiilor (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*),
 - **γ -hemolizina**: absența hemolizei (streptococii nehemolitici).

Medii diferențiale foarte utilizate sunt cele pe care se evidențiază capacitatea microbilor de a fermenta diverse zaharuri. Aceste medii conțin, pe lângă principii nutritivi, un zahar și un indicator de pH care își va schimba culoarea în prezența unui produs acid de fermentare.

Punerea în evidență a unor caractere biochimice (de metabolism) se realizează în practică, pe medii diferențiale solide sau lichide:

- mediile **politrope** permit identificarea concomitent a mai multor caractere biochimice: TSI (fermentarea glucozei, lactozei, mobilitate), MIU (mobilitate, producerea ureazei și indolului), MILF (mobilitate, producerea ureazei, indolului și fenil-alanin-dezaminazei și lizindecarboxilazei) pentru enterobacterii,
- mediul **Simons** (conține citrat și permite identificarea utilizării citratului ca unică sursă de carbon) pentru enterobacterii,
- mediul cu esculină, (azid, agar pentru enterococi), cu **lizină** sau cu **fenilalanină** (pentru evidențierea producerii de lizin decarboxilază și fenilalanin-dezaminază la enterobacterii),

În practică, proprietățile nutritive, selective și diferențiale se pot întâlni frecvent la același mediu ca, de pildă:

- mediul **Wilson Blair** pentru salmonele, conține ca factor selectiv verdele briliant, factorul de diferențial fiind producerea de H₂S. Reacția indicatoare este formarea sulfurii de bismut negru cu luciu metalic, prin reducerea sulfitului (proprietate de oxido-reducere).
- mediul **Chapman** este selectiv pentru stafilococi datorită conținutului de sare, însă este diferențial pentru aceștia, permițând identificarea speciilor pe baza fermentării manitolului din mediu: *S. aureus* (fermentează manitolul), iar *S.epidermidis* (nu fermentează manitolul),
- **Mac Conkey agar** este un mediu selectiv pentru enterobacterii (deoarece sărurile biliare din mediu inhibă flora gram pozitivă), dar și diferențial, prin fermentarea lactozei din mediu, ce permite identificarea și diferențierea speciilor *E. coli*, *Klebsiella* (fermentează lactoza) de *Salmonella*, *Proteus* (nu fermentează lactoza).
- toate **mediile cromogene** permit pe baza unor caractere de metabolism datorate descompunerii substraturilor cromogene conținute, diferențierea speciilor în cadrul aceluiși gen, a genurilor în cadrul aceleiași familii, și a familiilor între ele.

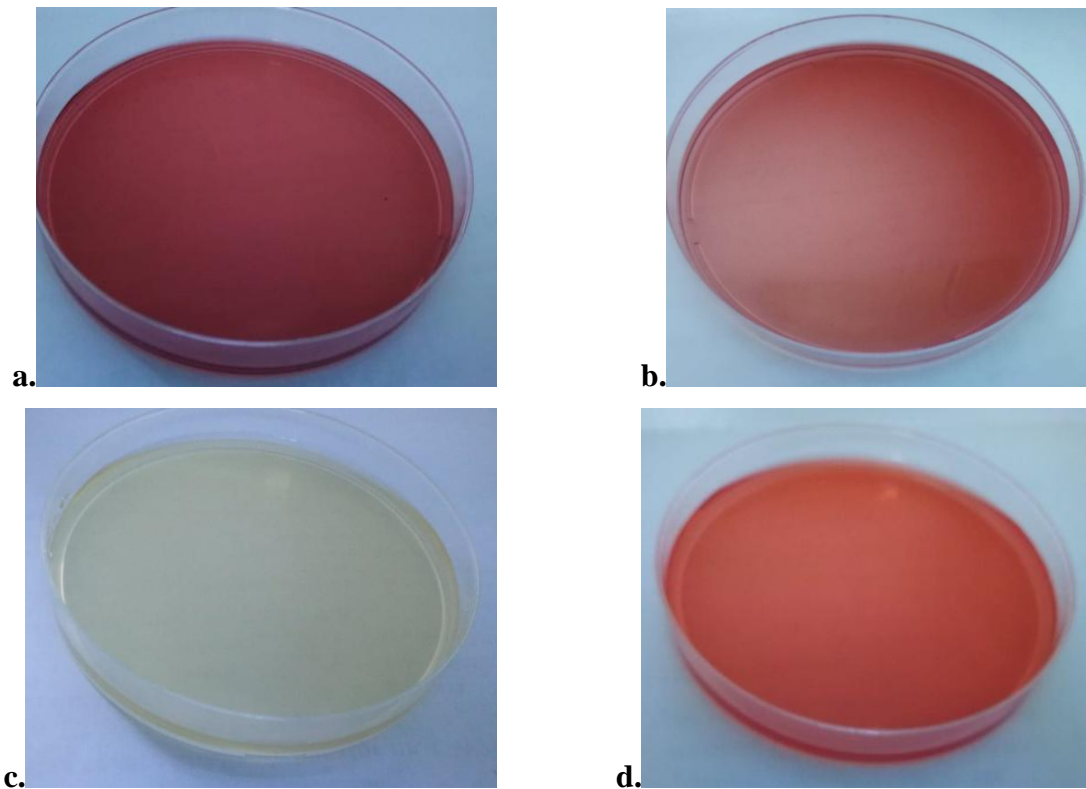


Figura 11: Medii diferențiale a. Mediu solid selectiv-diferențial - MacConkey, b. Mediu solid selectiv diferențial - Chapman (manitol-salt-agar), c. Mediu solid diferențial - CHROMagar UTI, d. Mediu solid compus - Geloză sânge (blood-agar)

În scop diagnostic se utilizează medii de cultură deshidratate cu o compoziție chimică bine definită, încorporate în minigodeuri din plastic. Galeria sunt formate din 10, 20, 32 etc. godeuri. Cu ajutorul acestor teste se detectează activitatea enzimatică, rezultatul fermentării zaharurilor, al catabolismului proteic sau al aminoacizilor, permițând prin intermediul substraturilor specifice și al unui indicator pH, virarea culorii, facilitând astfel identificarea germenului. Se utilizează asemenea galerii **API** cu diferite destinații:

- **API Staph** permite identificarea speciilor din genul *Staphylococcus*,
- **API 20 Strep** sau **32 Strep** identifică speciile de streptococi,
- **API 10S** sau **20E** sistem de identificare al bacililor gram negativi de tipul enterobacteriilor și non-enterobacterii,
- **API 20NH** sistem de identificare a bacteriilor gram negative din genurile *Neisseria* și *Haemophilus*,
- **API 20A** și **rapid 32A** pentru identificarea anaerobilor din genurile: *Bacteroides*, *Fusobacterium* și *Prevotella*,
- **API Candida** și **C AUX** pentru identificarea speciilor de *Candida* și dermatofiți etc.



a.



b.

Figura 12: Exemple de galerii API: a. API 20NH, b. API 10S

Mediile speciale sunt acele medii pe care se cultivă numai anumite bacterii sau medii cu indicații speciale, ca de exemplu:

- mediu *Löwenstein Jensen* pentru izolarea baciul Koch,
- mediul *Tynsdale* și *Gundel Tietz* pentru izolarea bacilul difteric,
- mediul *Bordet-Gengou* pentru cultivarea bacilul tusei convulsive,
- mediul *Sabouraud* pentru cultivarea fungilor,
- mediul *Mycoline* pentru cultivarea dermatofiților,
- *agar Mueller-Hinton simplu*, *agar Mueller-Hinton sânge*, *agar Mueller-Hinton chocolat* sau *agar HTM* (Haemophilus Test Medium) pentru testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a bacteriilor prin metoda difuzimetrică,
- *bulion Mueller-Hinton* pentru testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase prin metoda diluțiilor,
- *bulion tioglicolat* sau *bulion Shaedler creier* pentru izolarea anaerobilor din sânge (hemocultura).

4.3. Sursele de eroare în prepararea mediilor

Bacteriile sunt extrem de sensibile la modificări discrete ale mediilor de cultură. Din acest motiv trebuie să existe o preocupare permanentă pentru prepararea unor medii constante din punct de vedere al compoziției lor. Se întâmplă uneori ca dezvoltarea microbilor să nu se producă, să nu fie satisfăcătoare sau să modifice mediul de cultură în mod diferit. Sursele posibile de eroare sunt:

- alegerea unui mediu nepotrivit;
- eroare în măsurarea cantității de apă adăugată;
- cântărirea inexactă a materialului uscat;
- pH necorespunzător;
- distribuirea imprecisă și aseptică în recipiente;
- nerespectarea parametrilor obligatorii pentru sterilizare;
- sticlăria insuficient curățată, unele reziduuri fiind inhibitorii pentru microorganisme;
- întreruperea energiei electrice în timpul nopții cu scăderea consecutivă a temperaturii în termostat și nu în ultimul rând;
- recoltarea incorectă a probelor destinate diagnosticului microbiologic, care este una din cele mai frecvente cauze de eroare.

Mediile de cultură care se prepară în laborator se verifică în mod obligatoriu. Astfel, fiecare șarjă de mediu trebuie să fie testată prin însămânțarea unei tulpini martor în condiții standard.

În prezent mediile de cultură de bază, precum și reactivii suplimentari ce se adaugă, sunt produse de firme specializate, existând o adevărată industrie producătoare de medii în toată lumea. Firmele străine cu tradiție în prepararea mediilor de cultură sunt DIFCO în SUA, Merck în Germania, Unipath în Anglia, Biomerieux și Sanofi în Franța etc.

5. Principii generale de diagnostic de laborator al infecțiilor

Laboratorul de Microbiologie medicală are rolul de a preciza:

- diagnosticul etiologic al unei infecții,
- sensibilitatea bacteriilor identificate la antimicrobiene, în vederea alegerii preparatului cel mai performant pentru tratament
- evoluția speciilor și a rezistenței la antimicrobiene într-un spital, regiune.

Etapele diagnosticului de laborator al unei infecții pot fi reprezentate prin următoarea schemă generală:

I. Diagnosticul bacteriologic

- urmărește identificarea bacteriilor dintr-un produs biologic
- se desfășoară într-un interval de 24-72 h (în cazul infecțiilor monomicrobiene), putându-se prelungi în cazul hemoculturilor sau al culturilor cu *M.tuberculosis*.

ZIUA 1

1. Recoltarea probelor biologice trebuie să îndeplinească anumite condiții:

- să se realizeze cât mai aproape de debutul bolii,
- înainte de administrarea antibioticelor,
- respectarea regulilor stricte de asepsie,
- prin tehnici de recoltare corecte,
- alegerea produsului în funcție de manifestarea clinică a infecției

2. Transportul probelor biologice

3. Examenul macroscopic reprezintă o etapă utilă pentru orientarea diagnosticului:

Exemple:

- materii fecale de consistență redusă, apoase, cu mucus, striuri de sânge sau sangvinolente, cu resturi alimentare insuficient digerate, paraziți vizibili cu ochiul liber,
- urina tulbure, cu sediment, cu sânge (hematurie),
- LCR opalescent, purulent, galben-verzui («în zeamă de varză») sau sangvinolent,
- lichid de puncție pleurală: opalescent, purulent, hemoragic,
- spută purulentă, hemoptoică (cu sânge),

- secreții, colecții purulente de culoare galben-verzuie, albastrui (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* etc.).

4. Examenul microscopic direct din produs: este o etapă esențială care orientează pașii următori de diagnostic.

Se efectuează frotiu direct din produs biologic (LCR, spută, secreții otice, plăgi colecții purulente, secreții vaginale, urină) examinat în preparat nativ sau colorat (cel mai frecvent Gram). În unele cazuri diagnosticul bacteriologic se poate pune exclusiv pe baza examenului microscopic, fără etapele de izolare – identificare:

- asocierea fuso-spirilarare: angina ulcero-necrotică (flora bacteriană anaerobă) în angina Plaut-Vincent,
- vaginita parazitară cu *Trichomonas vaginalis*
- uretrita cu gonococ la bărbați

Avantajele examenului microscopic:

- rapid (5- 20 min), ieftin,
- oferă suficiente date pentru orientarea diagnosticului,
- util în urgențe: meningite, infecții tract respirator inferior, tuberculoză, infecții urinare, boala diareică acută etc.

5. Însămânțarea pe medii de cultură (cultivarea)

Se utilizează medii de cultură sintetice lichide, solide. Însămânțarea se face cu ansa bacteriologică (descărcare, dispersie) pentru obținerea de colonii izolate.

Condiții de incubare:

- temperaturi diferite: 37°C, 42 °C, 56 °C, 35 °C, 22 °C,
- atmosfera: aerob (O₂ + 5% CO₂), microaerofilă (N₂, CO₂, H₂), anaerob (absența O₂),
- umiditate,
- timp de incubare: 18- 24 ore, 48 ore, 5 zile, 7 zile, 60 zile,
- colonii izolate, cultură pură

ZIUA 2

6. Identificarea pe baza următoarelor caractere:

- morfo-tinctoriale (frotiu Gram/ albastru metilen/ Ziehl-Nielsen din colonie),
- culturale: colonii S/smooth (cremoase), R/rough (rugoase), M (mucoase, capsulate), hemoliza, pigment, invazie etc.
- teste biochimice: diferențiază pe baza proprietăților enzimaticice (vizualizate pe un substrat colorat, prin modificarea de pH, virare de culoare) specii bacteriene, în cadrul genului, familiei etc.
- teste antigenice: se utilizează anticorpi cunoscuți, pentru decelarea antigenelor necunoscute complementare.

Exemple:

- reacția de aglutinare pentru identificarea unor *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* etc.),
- reacția latex aglutinare pentru identificarea grupelor streptococice,
- coagulare pentru identificarea *S.aureus* etc.,

e. teste de patogenitate: identificarea factorilor de patogenitate

Exemple:

- coagulaza liberă la *Staphylococcus aureus*
- prezența hemolizinelor la stafilococi, streptococi

f. metode moleculare (extracție de acizi nucleici, amplificare, detecție)

7. Testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase (efectuarea antibiogramei)

ZIUA 3

8. Finalizarea identificării cu stabilirea agentului etiologic al infecției

9. Interpretarea antibiogramelor și încadrarea în fenotipuri de rezistență

10. Editarea, stocarea și interpretarea rezultatelor se face în prezent în format electronic în majoritatea laboratoarelor, prezentând avantajul:

- stocării unui număr nelimitat de informații,
- al redactării unitare și rapide a rezultatelor,
- al posibilității de reactualizare a oricărui rezultat,
- al efectuării interpretării statistice a trendurilor de rezistență bacteriană,
- precum și al colaborării rapide cu alte laboratoare de specialitate etc.

În cazul aspiratelor bronșice sau a altor produse polimicrobiene (când este necesară izolarea bacteriilor în cultura pură), precum și în cazul hemoculturilor (când incubarea durează între 48 h și 7-10 zile) diagnosticul este de durată.

II. Diagnostic serologic:

Urmărește evidențierea răspunsului imun umoral, adică titrarea anticorpilor specifici din serul pacienților (producerea de Ac/Ig de către LB/plasmocite are loc după întâlnirea cu un antigen specific), prin reacții de aglutinare, fixarea complementului (RFC), Elisa, RIA etc.

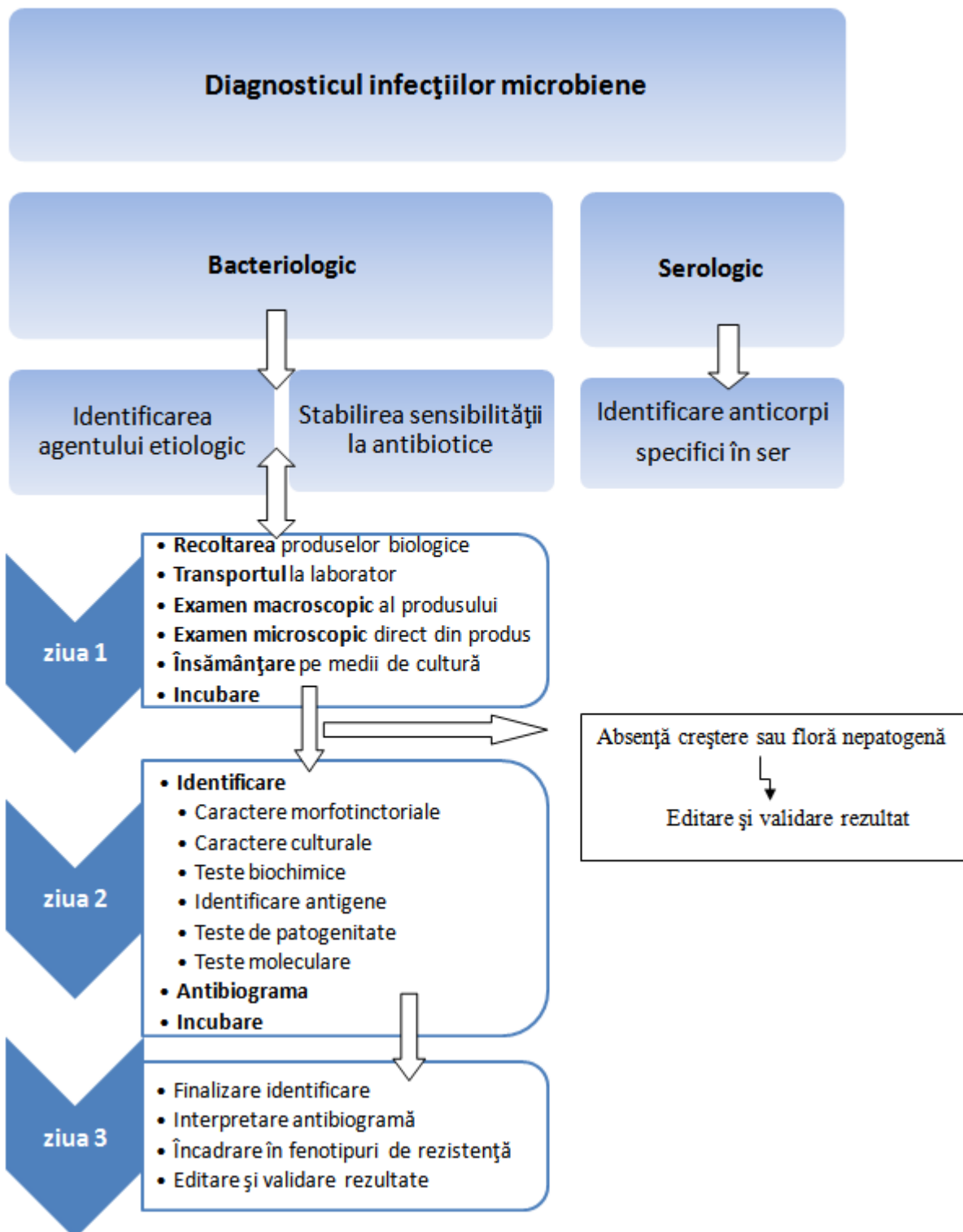


Figura 13: Etapele diagnosticului microbiologic

6. Recoltarea și transportul probelor

În alegerea metodelor de recoltare, conservare și transport a produselor biologice, a tehnicilor de prelucrare bacteriologică, cât și pentru interpretarea rezultatelor privind implicarea etiologică a bacteriei/bacteriilor izolate, este necesar să se țină seama de natura produsului în momentul prelevării sale. Din acest punct de vedere se diferențiază:

- probe în mod normal, sterile (sânge, L.C.R., exudate din seroase, urină)
- probe care se contaminatează în cursul eliminării din organism, cu flora normală a traiectelor de eliminare (urină, spută);
- probe contaminate (materii fecale, exudat nazo-faringian, puroi din plăgi, arsuri, secreții vaginale) și care provin din zone normal colonizate cu microbi ale organismului.

Recoltarea este unul din punctele de întâlnire dintre clinică și laboratorul de microbiologie.

Dacă recoltarea nu este corectă, nici o tehnică de laborator nu va putea îndrepta această eroare.

Greșelile de recoltare sunt cele mai frecvente cauze ale nereușitei diagnosticului microbiologic sau, mai grav, ale unui diagnostic eronat.

De aceea trebuie să se cunoască:

- care este *produsul biologic* în care se pot găsi bacteriile suspecte în funcție de etapa clinică de evoluție a bolii;
- care este *momentul optim* de recoltare în timpul zilei;
- dacă proba este în mod normal sterilă sau prezintă floră normală;
- care este *procedeul cel mai corect de recoltare* pentru a se evita contaminarea probei cu germeni din mediul extern. Instrumentele cu care se face recoltarea și recipientele în care se introduce proba trebuie să fie sterile;
- care este *cantitatea necesară* din fiecare probă;
- *cum trebuie ambalat* acel produs pentru a-i feri de contaminare pe cei care îl manipulează;
- care este *timpul optim* de transport la laborator *pentru a fi prelucrat*;
- care sunt *procedeele de conservare* a probelor când acestea nu pot fi trimise imediat la laborator;

Produsele biologice vor fi însoțite de buletinul de analiză în care trebuie înscrise: numele și prenumele pacientului, vârsta, domiciliul, numărul foii de observație, secția în care este internat, data internării, data și ora recoltării, diagnosticul de prezumție, felul și proveniența probei, indicații asupra tratamentului cu antibiotice urmat.

Laboratorul trebuie să insiste ca medicii practicieni să trimită, împreună cu proba, date anamnestice și orice alte date care să ajute laboratorul în alegerea celei mai rapide și performante metode de diagnostic. Nu este permis ca laboratorul să fie punctul de tranzit al unor probe fără nume și istoric.

Probele pentru care este solicitat laboratorul sunt, în general:

- secreții, excreții, umori, țesuturi ale organismului provenite de la bolnavi, convalescenți, purtători sănătoși;
- fragmente de țesuturi obținute prin autopsie sau biopsie;
- produse alimentare;
- produse farmaceutice;
- apă, aer.

În toate aceste produse se pot găsi microorganisme ce pot produce îmbolnăviri.

1. Secreția nazală (exudatul nazal)

La adulți, recoltarea se face cu tamponul nazal steril (câte un tampon pentru fiecare cavitate în parte), care poate să conțină mediu de transport.

Tehnica de recoltare: capul pacientului este imobilizat în extensie, tamponul este introdus per-nazal cu blândețe de-a lungul planșeului nazal până atinge peretele posterior al nazo-faringelui. Este lăsat local câteva secunde, apoi rotit ușor pentru a fi încărcat cu exudat, după care se retrage ușor. Cantitatea de prelevat crește dacă tamponul se retrage și se reinseră în aceeași poziție, prima tamponare stimulând secreția mucusului nazo-faringian. Tamponul este reintrodus în tubul protector și se trimite imediat la laborator sau se introduce în geluri/lichide conservante (mediu Amies, Stuart) până la prelucrare.

2. Secreția faringiană (exudatul faringian)

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

Tehnica de recoltare: pacientul este așezat cu gâtul în ușoară extensie, cavitatea bucală deschisă la maximum, faringele bine expus prin iluminare, baza limbii (fața dorsală) deprimată cu o spatulă (apăsător de limbă) sterilă. Bolnavul este invitat să pronunțe tare vocala A. Tamponul se introduce fără a atinge limba și palatul (pentru a nu contamina proba cu flora bucală) și mai ales lueta (pentru a nu declanșa reflexul de vomă). Se tamponează ferm, printr-o mișcare circulară și se șterge suprafața amigdalelor, peretele posterior al faringelui precum și orice zonă inflamată, ulcerată sau cu depozite purulente. Tamponul este scos cu precauție, se reintroduce în tubul protector și se trimite imediat la laborator sau se introduce în mediu de transport până la prelucrare.

3. Sputa

Recoltarea corectă este dificilă deoarece trebuie obținut un produs reprezentativ care să conțină microorganisme din spută, nu din salivă și din căile respiratorii superioare.

La adult recoltarea se face dimineața, deoarece în cursul nopții se adună secreții mai abundente.

Se pot face două tipuri de recoltări:

- **indirectă:** pacientul este invitat să efectueze o clătire energetică a cavității bucale cu ser fiziologic (nu se folosesc soluții antiseptice) și un periaj simplu al dinților apoi să tușească și să expectoreze într-un recipient steril (cutie Petri sau alt recipient steril de unică folosință), 2 ml în infecțiile acute, întreaga expectorație matinală sau cea eliminată într-un interval de 1-2 h la tușitorii cronici, la pacienții neintubați, cooperanți.
- **directă:** prin bronhoscopie sau prin puncție traheală.

La copii recoltarea se face prin spălătură gastrică sau sondaj gastric deoarece aceștia își înghit sputa.

4. Aspiratul traheobronșic

Recoltarea se poate realiza:

- în principal prin aspirație traheală inferioară, pe sonda de intubație, fiind cea mai facilă metodă pentru pacienții care necesită suport ventilator. Se efectuează prin intermediul unei sonde sterile introdusă prin sonda de intubație. După aspirație, sonda cu secrețiile recoltate se introduce într-un recipient steril cu bulion, secționându-se steril aproximativ 10 cm din ea, după care se transportă urgent la laborator;

- o altă tehnică utilizată a fost prelevarea bronhoscopică, mai ușor de efectuat în cazul pacientului din secții de terapie intensivă, datorită prezenței sondei de intubație orotraheală și a stării de conștiență afectată. Tehnica implică aspirația canalului bronhoscopului cu sau fără irigare bronșică și/sau periajul bronșic cu perie protejată în sistem de canule telescopate cu dop distal din polietilenglicol, care permite evitarea contaminării orofaringiene și/sau biopsia transbronșică. Pacientul este așezat în decubit dorsal la 45° sau decubit lateral (în cazul intubației orotraheale). Bronhoscopul este direcționat spre leziune, cateterul care protejează peria este inserat și culisat în canalul intern până forțează dopul de polietilenglicol. Acesta este netoxic și se va absorbi rapid în mucoasă. Sub control vizual peria este scoasă 1-2 cm și introdusă direct în exudatul leziunii, apoi retrasă prin canalul intern al bronhoscopului. Exteriorul cateterului este spălat cu alcool și uscat, iar peria, de pe care s-a retras cateterul, este separată aseptice, plasată într-un flacon de 1 ml soluție Ringer lactozată și transportată la laborator pentru însămânțare cantitativă, într-un interval de maxim 2 ore.

5. Secreția otică se recoltează cu tampon steril, și presupune poziționarea pacientului cu capul ușor aplecat în lateral, tracționarea lobului urechii în jos și anterior (pentru a expune orificiul auditiv extern), introducerea tamponului de-a lungul conductului auditiv și rotirea câteva secunde pentru colectarea secrețiilor existente. După aceasta, se retrage ușor tamponul și se introduce în tubul protector.

6. Secreția conjunctivei oculare

Recoltarea se face cu un tampon steril, de unică folosință (câte un tampon pentru fiecare ochi în parte), cu poziționarea pacientului cu gâtul în ușoară extensie, cu ochiul deschis, după care se șterge mucoasa de la nivelul unghiului intern al ochiului, cu colectarea secrețiilor de la nivelul sacului lacrimal, fără a atinge tegumentul. Se introduce apoi în tubul protector și se trimite imediat la laborator. Se recomandă ca recoltarea să o facă medicul oftalmolog care să efectueze în timpul recoltării și 2-3 frotiuri. Tamponanele trebuie să fie însămânțate cât mai rapid, deoarece lacrimile conțin lizozim care în timpul transportului atacă peretele celular al bacteriilor gram pozitive.

7. Sângele

Sângele este un produs în mod normal steril, având la dispoziție capacitatea de clearance microbial. Ca produs patologic acesta poate fi recoltat pentru examen bacteriologic sau pentru examen serologic.

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

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

Presupune respectarea condițiilor:

- personal calificat (cu respectarea regulilor de igienă mâinilor, utilizarea măștii, mănușilor de protecție),
- antiseptizarea tegumentelor cu o soluție de alcool și chlorhexidină,
- după puncția venoasă - se însămânțează sângele imediat pe: 3 seturi de flacoane (de tip BACTALERT® sau BACTEC®), care conțin medii de cultură lichide pentru bacterii aerobe, anaerobe și fungi,
- cu asigurarea unui raport adecvat sânge/mediu (1/10-1/5), adică 5- 10 ml sânge venos la 50 ml mediu lichid de cultură (raport optim pentru diluarea sângelui și împiedicarea activității factorilor antimicrobieni naturali)

înainte de inițierea antibioterapiei!!!!

Tehnica de recoltare: se așază pacientul cu brațul confortabil pentru a evidenția cât mai bine venele de la plica cotului (la sugar se recoltează sânge prin puncția venei jugulare). Se decontaminează plica cotului pe o suprafață mare, cu produse biocide care se regăsesc în registrul de biocide. Se aplică garoul deasupra plicii cotului pentru hemostază și evidențierea venelor. Se imobilizează vena cea mai accesibilă cu arătătorul mâinii stângi și cu dreapta se puncționează, extrăgându-se 5-10 ml de sânge (la sugar 1-3 ml sânge). După recoltare se dă drumul la garou, se retrage acul și se face hemostaza cu tampon de vată cu alcool. Apoi se schimbă acul de puncție cu acul de rezervă. Sângele se însămânțează imediat pe medii de cultură lichide, în cele 3 seturi de flacoane, agitând ușor, pentru omogenizarea cu mediul.

În prezent există pe piață flacoane cu medii de cultură ce conțin substanțe cu efect neutralizant asupra antibioticelor (utile în cazul în care pacientul a fost tratat cu antibiotice).

După recoltare, flacoanele de hemocultură se vor eticheta corect și vor fi trimise către laboratorul de microbiologie. Mediile de cultură astfel însămânțate se introduc în incubatoare speciale de tip Bactec® sau Bactalert®, care asigură temperatura de 37°C și semnalizează prin semnal luminos și sonor hemoculturile pozitive/negative. Cele pozitive vor fi ulterior însămânțate de către personalul din laborator pe medii solide în vederea identificării germeilor.

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

8. Puroiul

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

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

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

9. Secreția de plagă se recoltează astfel: după o prealabilă toaletă a plăgii cu ser fiziologic steril, se șterge plaga în profunzime cu tamponul steril, se învârte vârful timp de 5 secunde pe o arie de 1 cm², suficient de ferm pentru a provoca o ușoară sângerare; se introduce tamponul în tubul cu mediu de transport și se trimite spre laborator în maxim 1 oră.

10. Materiile fecale

În general, se examinează probele de scaun eliminat spontan. Pacientul este instruit să nu contamineze scaunul cu urină, după care este invitat să defecă într-un recipient steril cu mediu de transport prevăzut cu dop etanș la care este adaptată o linguriță (coprorecoltor). Imediat după defecare se vor preleva cu lingurița sterilă, montată la dopul coprorecoltorului (sau cu ajutorul fecal-swabului) porțiuni patologice ca: fragmente mucoase, sanguinolente, fragmente riziforme, puroi, când acestea există, sau fragmente de fecale recoltate din diferite porțiuni ale unui scaun omogen. După recoltare se suspensionează 1 g de produs patologic în mediul de transport conținut în coprorecoltor sau fecal swab. Proba astfel recoltată se trimite imediat la laborator pentru prelucrare.

Pentru depistarea portajului de enterobacterii patogene, se examinează probele de scaun provocat cu ajutorul purgativelor.

În cazul în care este dificilă obținerea materiilor fecale prin eliminare spontană se pot efectua și prelevări pe tampon rectal. Prelevarea pe tampon rectal sub control rectoscopic se efectuează mai ales la pacienții cu sindrom dizenteriform. Tamponul steril se trece prin orificiul anal, se șterge cu grijă mucoasa rectală după care se retrage ușor. Imediat după prelevare se introduce tamponul în mediul de transport al coprorecoltorului și se trimite la laborator pentru prelucrare.

11. Urina se recoltează pentru urocultură în vederea evidențierii microorganismelor patogene. Recoltarea se face identic la bărbați și femei.

Prelevările uzuale constau în:

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

- Cateterismul se practică numai la pacienții care nu pot urina spontan și este de competența medicului urolog deoarece expune pacientul riscului infecției. Pentru prevenirea infecției se recomandă manipularea aseptică a cateterului.

- Aspirația suprapubiană este singura metodă de prelevare pentru depistarea bacteriilor anaerobe în urină și este cea mai eficientă metodă de evitare a contaminării uretrale a probelor. Pacientul este bine hidratat și se abține de la micțiune până când percuția suprapubiană depistează matitatea vezicală iar palparea declanșează necesitatea micțiunii urgente. Regiunea suprapubiană este pregătită prin epilare și decontaminată cu alcool iodat, după care se abordează vezica urinară prin puncție deasupra simfizei pubiene cu o seringă de 10 ml la care este adaptat un ac pentru puncție.

Urina se expediază imediat la laborator după prelevare pentru a fi examinată la maxim o oră de la recoltare, sau se refrigerază la +4°C până în momentul prelucrării.

Prelevarea urinei de la nou-născuți, sugari: se decontaminează și usucă organele genitale externe și perineul - se fixează în jurul penisului sau a vulvei orificiul unei pungi din material plastic sterile, iar urina colectată se transferă aseptice într-un recipient steril cu capac. înșurubabil.

12. Secreția uretrală:

- La femei recoltarea se face dimineața înainte de urinare. Pacienta se așază în poziție ginecologică, pentru evidențierea cât mai pronunțată a meatului uretral, după care se practică decontaminarea organelor genitale externe folosind apă, tampon și pense sterile urmată de uscarea cu tampon de tifon steril. Se pătrunde cu indexul înmănușat în vagin și se retrage în lungul uretrei, iar exudatul care se obține se prelevă cu un tampon de vată de la nivelul meatului. Prelevarea se poate face și cu ajutorul unui tampon care se inseră pe o distanță mică în lumenul uretral.

- La bărbați, recoltarea se face dimineața înainte de urinare. În uretritele acute se recoltează scurgerea uretrală spontană. De asemenea, este obligatorie recoltarea secreției din interiorul uretrei. În acest scop se introduce în uretră pe o distanță de 1-2 cm un tampon subțire care se rotește câteva secunde prevenind bolnavul că manevra este puțin dureroasă. Prin această manevră se obțin celulele epiteliale uretrale în care se multiplică chlamyidiile, cauză frecventă a uretritelor. Tamponul de prelevare poate fi înlocuit cu o ansă sterilă, introdusă în uretră urmând aceleași indicații ca și în cazul tamponului. Probele astfel recoltate se prelucrează imediat.

La pacienții cu uretrite cronice secreția este redusă apărând sub forma unei picături matinale. Pentru a mări cantitatea de secreție se recomandă pacientului să bea cu o seară înainte de recoltare 2 pahare cu bere și să nu urineze începând cu ora 2 dimineața.

13. Recoltarea corectă a secrețiilor genitale la femei este hotărâtoare pentru diagnostic. Astfel, unii germeni implicați în patologia vaginală cum sunt *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Gardnerella*, se găsesc în secreția din fundul de sac posterior al vaginului. Gonococul, însă, precum și chlamydiile se multiplică numai în colul uterin. De aceea este obligatorie recoltarea simultană a celor 2 probe. Recoltarea se efectuează în cabinetul de ginecologie.

Secreția vaginală din fundul de sac se recoltează cu 2-3 tampoane sterile (după o prealabilă toaletă a organelor genitale externe, cu o seară înainte de efectuarea analizei). Tamponul destinat cultivării se introduce în mediu de transport, iar cel destinat examenului microscopic se întinde pe lama în vederea colorării.

Secreția cervicală. După îndepărtarea mucusului de pe colul uterin, se inseră ferm tamponul în col și se rotește 10 secunde pentru a obține un număr cât mai mare de celule epiteliale endocervicale. Recoltarea va fi făcută doar de medicul specialist. Recoltarea se poate face și cu o perie citologică, ceea ce crește sensibilitatea metodelor de diagnostic. Peria citologică se poate utiliza însă numai la femeile neînsărcinate (fiind riscantă pentru femeile gravide).

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

14. Lichidul cefalorahidian

Recoltarea LCR se efectuează la patul bolnavului, prin puncție lombară (rahidiană) sau occipitală, în condiții riguros aseptice folosind ace speciale cu lungimea de 6-10 cm și diametrul de 1 mm. Volumul necesar pentru examenele bacteriologice, biochimice și citologice este de 10-15 ml la adulți și 2-10 ml la copii, volum repartizat în mod egal în trei eprubete diferite. Transportul la laborator se face imediat și la o temperatură cât mai apropiată de 37°C (meningococul fiind foarte sensibil la variațiile de temperatură). Lichidul rahidian trebuie să ajungă încă "cald" la laborator. În caz contrar, un rezultat - LCR-steril - este fără valoare.

Transportul probelor. Modul în care sunt transportate la laborator probele este, în general, foarte important și medicul practician trebuie să se informeze asupra acestei probleme. De pildă, dacă se urmărește izolarea bacilului dizenteric în materiile fecale și laboratorul este la distanță de locul recoltării, medicul trebuie să știe că bacilul dizenteric este sensibil și că trebuie protejat de un mediu de transport (Amies, Stuart etc.).

Secreția uretrală în care se urmărește izolarea gonococului se însămânțează direct de către medicul care o recoltează, deoarece gonococul, ca și meningococul, este sensibil la variațiile de temperatură și nu rezistă prea mult în mediul ambiant.

De asemenea, produsele în care se suspectează prezența germenilor anaerobi trebuie să se însămânțeze cât mai curând cu putință și să fie ferite de contactul cu oxigenul.

Există în prezent pe piața tamponi sterili cu mediu de transport lichid de tip Amies (Eswab), care prezintă mai multe avantaje:

- menținerea viabilității germeilor aerobi/anaerobi peste 48 de ore atât la temperatura frigiderului cât și temperatura camerei,
- permit însămânțarea tamponilor pe sistem automat
- dintr-un ml de mediu lichid Amies se pot face mai multe teste, inclusiv frotiuri.

Regula generală este ca probele să ajungă în timpul cel mai scurt la laborator și mai ales în programul de lucru al laboratorului. Dacă proba necesită prelucrare imediată, acest lucru trebuie menționat în buletinul de trimitere.

Nu trebuie să se neglijeze faptul că orice probă este o posibilă sursă de contaminare pentru întreg personalul care o mănuieste.

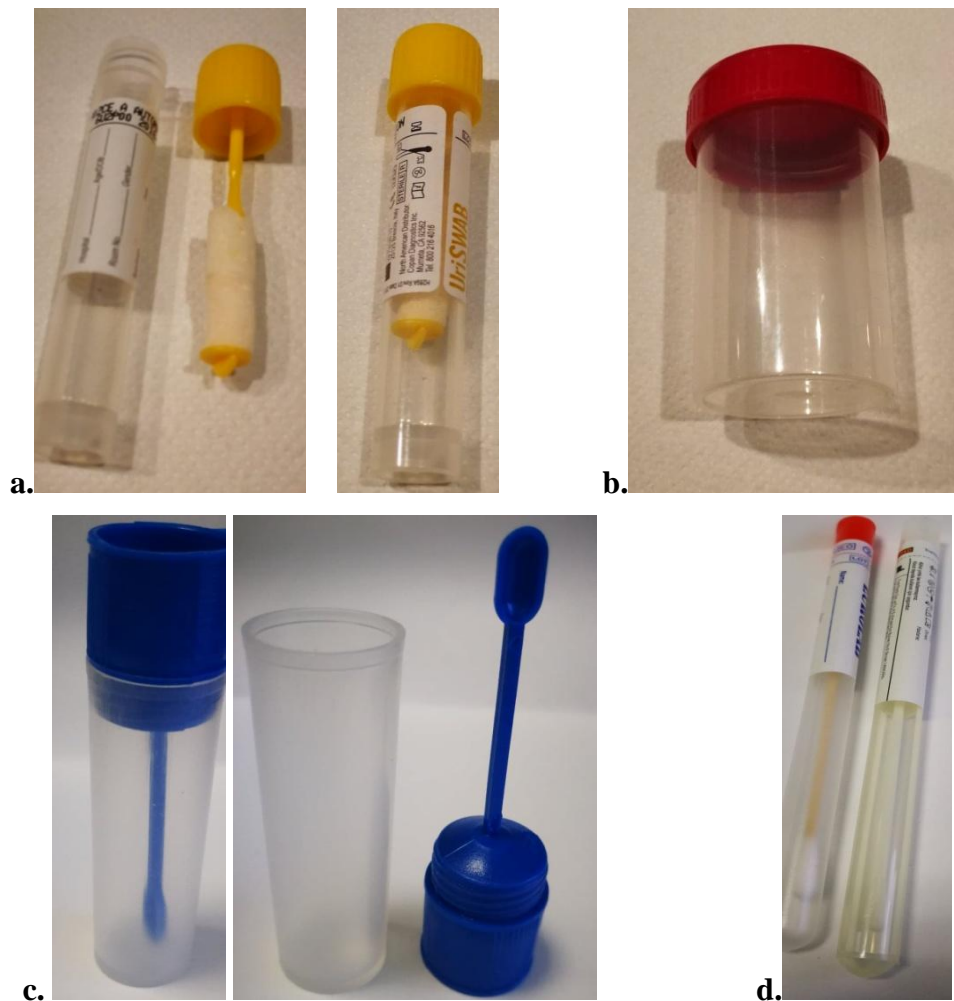


Figura 14: Recipiente sterile pentru recoltarea de probe biologice: a.1. Sistem de recoltare și transport probe urină, b. Recoltor universal, c. Coproductor, d. Tamponi sterili în tuburi

7. Examenul direct macroscopic și microscopic al produselor recoltate.

Când o probă ajunge în laboratorul de microbiologie se presupune că a fost corect recoltată. Totuși, uneori, examenul probelor poate evidenția greșeli de recoltare:

- sângele pentru hemocultură este recoltat pe substanțe anticoagulante,
- urina să fie adusă în laborator în recipiente “curate”, dar nu sterile, sau să aibă o culoare roz sau albastră datorită administrării prealabile de urodezinfectante.

6.1. Examenul macroscopic

Are valoare importantă nu numai pentru a depista greșelile de recoltare ci, uneori, chiar în orientarea diagnosticului bacteriologic.

La lichidul cefalo-rahidian se urmărește culoarea, turbiditatea, prezența depozitului sau a cheagului înainte de a fi supus centrifugării. În mod normal LCR este limpede “ca apa de stâncă”. În prezența semnelor meningeale (febră, redoarea cefei, fotofobie) chiar și un LCR limpede pledează pentru o meningită virală sau tuberculoasă. Un LCR tulbure demonstrează prezența leucocitelor și indică o infecție bacteriană.

Puroiul. Se urmărește culoarea, consistența și mirosul. Culoarea puroiului variază în funcție de prezența pigmentului bacterian. Bacteria piogenă cel mai frecvent întâlnită în patologia infecțioasă este *Staphylococcus aureus*, care produce un puroi galben cremos. Puroiul în infecțiile produse de bacilul piocianic (*Pseudomonas aeruginosa*), este verde albastrui cu miros aromat. Puroiul din infecția cu actinomicete este grunjos.

La urină se urmărește culoarea, gradul de turbiditate, prezența și natura sedimentului (dacă acesta există), prezența filamentelor. Dacă urina este tulbure trebuie stabilit dacă acest lucru se datorează prezenței leucocitelor sau sărurilor. O încălzire ușoară, la flacără, a urinei duce la dispariția turbidității datorată sărurilor.

La spută se urmărește aspectul, culoarea, aderența, prezența fragmentelor purulente. În pneumonia pneumococică sputa are o culoare ruginie patognomonică. În tratatele mai vechi de semiologie medicală se spunea că “bolnavul își scuipă diagnosticul”.

La materiile fecale căutăm prezența puroiului, a sângelui sau a excesului de mucus. În dizenterie patognomonică sunt scaunele mucopurulente și sanguinolente.

6.2. Examenul microscopic

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

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

Prin microscopie se examinează:

- preparate native între lamă,
- frotiuri fixate, colorate,
- preparate colorate cu substanțe fluorescente la microscopul cu lumină UV.

Preparatul nativ între lamă și lamelă, în lumină directă este utilizat pentru evidențierea unor celule (PMN, eritrocite), a germenilor mobili în probe lichide (urină, LCR sau lichidul din chisturi), a protozoarelor din urină, materii fecale etc. Este de asemenea indicat pentru examinarea grunțiilor din puroiul leziunilor cu *Actinomyces* sau cu *Nocardia*.

În materiile fecale (suspensie în ser fiziologic steril sau Lugol) se pot observa de exemplu bacterii cu mobilitate caracteristică “în spirală”, “în tirbușon”: *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Vibrio cholerae* sau prezența elementelor parazitare/ouă, chisturi etc. În secreția vaginală se poate vizualiza prezența, morfologia și mobilitatea caracteristică pentru *Trichomonas vaginalis*.

Examenul în câmp întunecat se utilizează pentru decelarea *Treponemei pallidum*, coroborat cu datele clinice, poate stabili etiologia infecției.

Frotiul colorat efectuat direct din produsul recoltat furnizează date care se referă la prezența celulelor inflamatorii (PMN, macrofage), morfologia bacteriilor (coci, bacili, vibrioni, spirili), dispoziția lor (în ciorchine, grămezi, diplo, tetrade, lanțuri, palisade, litere chinezești sau majuscule), relația lor cu celulele existente în produsele biologice (intra sau extracelular). Examenul microscopic permite și aprecierea obiectivă a calității acestora. Frotiul se poate efectua și din cultura microbiană, pentru orientarea ulterioară a testelor de identificare.

Tehnica: Pentru efectuarea unui frotiu colorat sunt necesare lame de sticlă curate și degresate, o ansă bacteriologică, pipete Pasteur și coloranți.

Etalarea. Din produsele patologice lichide se pot efectua frotiuri direct din produsul ca atare, cu o pipetă Pasteur. Se depune și se întinde o picătură pe lamă, având grijă să lăsăm libere marginile lamei. Frotiul se lasă să se usuce la temperatura camerei.

Când densitatea microbilor este scăzută într-un produs biologic lichid (LCR, urină) acesta se supune centrifugării la 3000 de turații/minut timp de 10 minute, iar frotiul se efectuează din sediment. Se încarcă bucla ansei sterile cu o cantitate din sediment și se etalează pe mijlocul unei lamei în strat subțire.

Fixarea este necesară pentru aderarea produsului biologic de lamă, omorârea bacteriilor și pentru înlesnirea adsorbției colorantului pe suprafața acestora. Frotiurile se fixează înainte de colorare, cel mai ades la flacără. Lama se trece de 3-4 ori prin flacără, încălzind-o pe fața opusă frotiului. Fixarea cu alcool metilic sau soluție May-Grünwald-Giemsa se preferă acolo unde se urmărește și morfologia celulelor din produs.

Colorații de rutină în laboratorul de microbiologie. Frotiurile se pot colora simplu cu un singur colorant, elementele preparatului având toate aceeași culoare, eventual intensitate diferită, sau diferențiat cu mai mulți coloranți, bacteriile colorându-se diferit în funcție de caracterele morfotinctoriale.

Frecvent utilizate în laborator sunt colorația simplă cu albastru de metilen și colorațiile diferențiale Gram și Ziehl-Neelsen. În cazul în care citologia are o valoare diagnostică deosebită, frotiurile se pot colora May-Grünwald-Giemsa.

1. Colorația simplă cu albastru de metilen. Frotiul fixat la flacără se acoperă cu albastru de metilen, care se lasă să acționeze 1-2 minute, se spală apoi cu apă, se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Fondul preparatului apare colorat în albastru-deschis, iar bacteriile în albastru-închis. Evidențiază citologia, prezența leucocitelor, PMN, limfocitelor, levuri etc.

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

Principiul colorației constă în colorarea bacteriilor cu un colorant acridinic de tip cristal violet și mordansarea cu soluție de lugol (soluție iodo-iodurată de K). Ca urmare, se formează complexe insolubile cu acidul ribonucleic celular, de culoare violet. Diferența dintre bacteriile Gram pozitive și Gram negative constă în diferența de permeabilitate a peretelui celular pentru aceste complexe (datorita structurii sale diferite la Gram pozitive/negative), după decolorare cu alcool-acetonă sau alcool absolut. Bacteriile Gram pozitive păstrează complexele violet pe când cele Gram negative le pierd, devenind incolore. Acestea se vor recolora în roșu fie cu fuxină, fie cu safranină. Trebuie subliniat că bacteriile Gram pozitive păstrează complexele violet numai dacă structura peretelui este intactă. Dacă celula bacteriană are peretele celular alterat, ea va pierde aceste complexe.

Tehnica colorației:

- frotiul fixat la flacără se acoperă cu soluție de cristal violet timp de 1 minut,
- se spală lama cu lugol și se acoperă cu lugol 2 minute (iodul servește ca mordant în colorație);
- se îndepărtează lugolul și se decolorează câteva secunde cu alcool-acetonă sau 2 minute cu alcool absolut;
- se spală cu apă;
- se acoperă lama cu soluție de fuxină fenicată diluată 1/10 câteva secunde;
- se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Colorația Gram evidențiază prezența microorganismelor, morfologia (forma, mărime, dispoziție caracteristică), tinctorialitatea (Gram pozitive /Gram negative), frecvența PMN, relația cu PMN neutrofile (intr- / extraleucocitari).

După examinarea directă microscopică a frotiurilor colorate Gram, microbiologul poate face un raport preliminar pe care îl transmite medicului practician. Acesta va putea lua o decizie terapeutică până la sosirea rezultatului culturii și a antibiogramei.

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

Tehnica:

- se fixează frotiul la flacără;
- se acoperă frotiul cu soluție de fuxină fenicată Ziehl, se încălzește până la apariția vaporilor, repetându-se această încălzire de 3 ori în decurs de 10 minute (pentru încălzire se utilizează o tijă metalică care are montat un tampon de vată la unul din capete; tamponul se umectează cu alcool și se aprinde);
- se decolorează cu acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric 1/5 până dispare culoarea roșie;
- se spală cu apă;
- se recolorează cu soluție de albastru de metilen 1-2 minute;
- se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscop.

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

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

4. Colorația Giemsa se utilizează pentru preparatele de sânge, secreții vaginale, uretrale, exudate din seroase, puncții medulare etc. Permite vizualizarea cu acuratețe a morfologiei celulare (anomalii, atipii, suspiciune de modificare neoplazică), aprecierea cantitativă a predominanței PMN, etiologia bacteriană.

Tehnica:

- frotiul se fixează cu alcool metilic sau alcool-eter în părți egale, timp de 2-3 minute;
- se acoperă apoi cu soluție Giemsa diluată timp de 20-23 minute;
- se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Exemple practice:

Examenul microscopic al LCR. Din LCR se efectuează un preparat nativ în camera de numărât pentru a aprecia densitatea celulară (leucocite și eritrocite).

Pentru frotiuri fixate și colorate, LCR se centrifughează 5 minute la 3000 de rotații/minut. Se decantează supernatantul, iar din sediment se efectuează trei frotiuri care se colorează Gram sau Ziehl-Neelsen (pentru BAAR).

În situația în care LCR este tulbure și conține numeroase PMN, agentul cauzal este probabil *N. meningitidis*, *Str. pneumoniae* sau *H. influenzae*. La colorația Gram se pot observa microbii enumerați. Efectuarea frotiului colorat Ziehl-Neelsen are importanță deosebită în diagnosticul tuberculozei. În sedimentul LCR, în meningite levurice, la bolnavii imunodeprimați/SIDA, se mai pot observa levuri încapsulate (*Cryptococcus neoformans*).

Examenul microscopic al puroiului. Frotiurile efectuate direct din puroi se colorează Gram. Pe aceste preparate se evidențiază în primul rând PMN și apoi diverse bacterii (stafilococi, streptococi etc.) sau, mai rar, fungi. În cazul suspiciunii unei actinomicoze, se zdrobesc grunții din puroi între 2 lame care se despart și apoi se colorează Gram.

Un ochi experimentat poate observa pe frotiurile din puroi colorate Gram coci anaerobi datorită formei lor neregulate și a dispoziției.

Examenul microscopic al urinei. Urina se va centrifuga și din sediment se vor efectua frotiuri colorate Gram și Ziehl-Neelsen (TBC renală). Într-o infecție urinară, pe frotiul colorat Gram se observă în afară de flora bacteriană mobilă, numeroase PMN, hematii, celule epiteliale, cristale, levuri.

Din sedimentul de urină se poate efectua și un preparat nativ între lamă și lamelă. Dacă urina este proaspătă se poate evidenția *Trichomonas vaginalis* datorită mișcărilor caracteristice.

Examenul microscopic al sputei. Pentru a efectua un frotiu din spută, se spală sputa cu ser fiziologic în placa Petri în care a fost recoltată. Mucozitățile se trec în altă placă Petri și se spală din nou. Spălarea este obligatorie pentru îndepărtarea microorganismelor contaminante din faringe, care s-au atașat de spută în timpul recoltării. Mucozitățile se triturează și din materialul rezultat se efectuează frotiuri și culturi.

Lamele se fixează la flacăra și se colorează, una Gram, una Ziehl-Neelsen (*M. tuberculosis*) și una Giemsa pentru evidențierea unui parazit (*Pneumocystis carinii*). Colorația Gram poate semnala prezența streptococilor, stafilococilor, pneumococilor, *H. influenzae*.

Examenul microscopic al produselor obținute prin biopsie sau autopsie. Fragmentul de țesut obținut prin biopsie sau autopsie se apasă pe suprafața lamei de sticlă realizându-se în acest fel amprente. Frotiurile se fixează la flacăra și se colorează Gram și Ziehl-Neelsen (dacă se suspectează o infecție tuberculoasă).

Tabelul nr. 3: Exemple de bacterii Gram pozitive/negative

TINCTORIALITATE	FORMA BACTERIILOR	FAMILIA/GRUPUL		GENUL	AȘEZARE
	COCI				
GRAM POZITIVI		<i>Micrococaceae</i>		<i>Staphylococcus</i>	gramezi
		<i>Streptococaceae</i>		<i>Streptococcus</i> <i>S.pneumoniae</i> <i>Enterococcus</i>	diplo/lanțuri
	BACILI	Sporulați	Aerobi	<i>Bacillus</i>	lanțuri/diplo
			Anaerobi	<i>Clostridium</i>	sporul dispus central sau terminal
		Nesporulați		<i>Corynebacterium</i>	litere chinezești/ majuscule
				<i>Listeria</i>	cocobacili
GRAM NEGATIVI	COCI	<i>Neisseriaceae</i>		<i>Neisseria</i>	În diplo cu concavitățile față în față
	BACILI	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Escherichia</i>	neregulată
				<i>Salmonella</i>	
				<i>Shigella</i>	
				<i>Klebsiella</i>	
				<i>Enterobacter</i>	
				<i>Proteus</i>	
				<i>Morganella</i>	
				<i>Yersinia</i>	
		Non-fermentativi		<i>Pseudomonas</i>	
				<i>Acinetobacter</i>	
		<i>Vibrionaceae</i>		<i>Vibrio</i>	virgulă
		<i>Spirillaceae</i>		<i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>	spiralați incurbați
		Diverse		<i>Haemophilus</i>	cocobacili
		<i>Brucella</i>			
		<i>Bordetella</i>			

8. Izolarea germenilor din probele recoltate pe medii de cultură

Nu se pot stabili reguli rigide cu privire la izolarea și cultivarea in vitro a microorganismelor. Calea de urmat este determinată de produsul biologic, care este hotărâtor în alegerea mediului de cultură. Medicul microbiolog trebuie să știe ce microorganisme pot fi întâlnite în diversele produse recoltate de la pacienți, pretențiile nutritive ale acestora și posibilitățile de cultivare.

Scopul cultivării este obținerea bacteriilor sub formă de colonii izolate care vor fi în continuare identificate pe baza caracterelor culturale, de metabolism, de patogenitate și antigenice.

Există medii de cultură pentru aproape toate bacteriile. Totuși unele bacterii ca de pildă *Treponema pallidum* și *Mycobacterium leprae* nu se pot cultiva. Chlamydiile și rickettsiile necesită, ca și virusurile de altfel, sisteme vii de cultivare (culturi de celule, ouă embrionate, animale de experiență) inaccesibile laboratoarelor de rutină.

La germenii necultivabili sau greu de cultivat în condiții de rutină, diagnosticul se va baza pe evidențierea directă a acestora sau a antigenelor lor în produsul biologic (IF, Elisa, PCR etc.) sau pe examene serologice.

Probele pot fi însămânțate pe medii lichide, în care germenii cresc în amestec, sau pe medii solide unde dezvoltă colonii. Preferabile sunt mediile solide, dar sunt situații în care însămânțarea primară se face pe un mediu lichid uzual (bulion, de pildă pentru hemocultură) sau de îmbogățire (izolarea salmonelelor pe mediul Mueller-Kauffmann etc.) și ulterior pe mediu solid.

Probele biologice normal sterile (urină, LCR, lichid articular, lichid pleural, puroiul din colecții închise, prelevatele obținute prin biopsie sau autopsie) se însămânțează în general pe medii solide neselective (geloză sânge, geloză/sânge chocolat etc.) într-o atmosferă de microaerofilie.

Alegerea mediilor pentru **produsele din sedii cu floră normală** depinde de gradul de contaminare a acestor probe. Astfel, exudatul faringian se poate însămânța pe geloză sânge, pe când materiile fecale necesită mai multe medii de îmbogățire și selective care să permită izolarea fiecărei specii posibil infectante. Același produs trebuie uneori însămânțat pe mai multe medii, deoarece poate conține bacterii cu necesități nutritive diferite.

Însămânțarea constă în depunerea unei probe sau a unui inocul (număr mic de bacterii) într-un mediu de cultură în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea este reînsămânțarea unei tulpini microbiene de pe un mediu de cultură pe altul.

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

Pentru însămânțări se utilizează în general ansa bacteriologică.

Placa Petri pe care urmează să o însămânțăm se introduce în termostat la 37°C cu capacul întredeschis pentru ca suprafața mediului să se usuce. Dacă uscarea nu este corespunzătoare, coloniile vor conflua și nu se vor mai dezvolta izolat. Placa se pune pe masa de lucru cu capacul în jos. Se ia placa cu mâna stângă. O mică porțiune din produsul bacterian se dispersează pe un sector limitat al plăcii fie cu ansa, dacă proba se află într-un recipient, fie cu tamponul cu care s-a efectuat recoltarea. Ansa se sterilizează (sau se folosesc anse de unică folosință). Se trece cu ansa peste suprafața însămânțată inițial iar apoi se descriu 3-4 striuri

paralele la o distanță de 5 mm unul de celălalt pe un alt sector al plăcii (vezi figura 15). Se repetă operația pe sectoare noi până ce placa este epuizată, astfel încât coloniile vor fi mai rare pe ultimul sector însămânțat.



Figura 15: Tehnica de însămânțare

Incubarea constă în menținerea mediilor de cultură însămânțate în condiții optime de temperatură și presiune de oxigen. În general, culturile se dezvoltă la 18-24 de ore după incubare. Unele specii însă, necesită un timp mai lung, ce durează de la zile la săptămâni.

Temperatura optimă pentru majoritatea bacteriilor este de 37°C, dar există bacterii care preferă temperaturi de 28°C, cum sunt leptospirele.

În raport cu necesarul de oxigen, bacteriile strict aerobe și facultativ anaerobe se cultivă în prezența aerului atmosferic, cele microaerofile într-o atmosferă de microaerofilie. Astăzi se incubează majoritatea izolatelor primare în atmosferă de CO₂ deoarece acesta favorizează dezvoltarea microbiană.

8.1. Cultivarea produselor biologice normal sterile

Sângele pentru hemocultură se recoltează în septicemii și ideal este ca însămânțarea să se facă la patul bolnavului pe seturile de flacoane cu bulion descrise (la capitolul Recoltare). Coagularea sângelui trebuie împiedicată dar nu prin anticoagulante, care au acțiune antibacteriană, ci prin diluția sângelui în mediul de cultură (raport 1/10). Mediile de cultură astfel însămânțate se introduc în incubatoare speciale de tip Bactec sau Bactalert, care asigură temperatura de 37°C și semnalizează prin semnal luminos și sonor hemoculturile pozitive/negative. Cele pozitive vor fi ulterior însămânțate de către personalul din laborator pe medii solide în vederea identificării germenilor. Din flacoanele pozitive se vor efectua subculturi pe mediile de cultură corespunzătoare (medii solide destinate creșterii germenilor aerobi, anaerobi sau fungi). Bacteriile care se pot multiplica în torentul sanguin aparțin celor mai diverse familii și specii bacteriene aerobe sau facultativ aerobe Gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus*), Gram negative (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) sau fungi. Bacterii de tipul stafilococilor coagulazo-negativi sunt considerate contaminanți.

Astăzi există o mare varietate de medii de cultură oferite de diverse firme producătoare care asigură necesitățile nutritive ale unei game largi de bacterii, astfel încât ușurează și îmbunătățesc performanțele hemoculturii.

Urina este un produs biologic steril și infecțiile tractului urinar (ITU) sunt cel mai des monomicrobiene. Mediile pe care se însămânțează urina sunt geloza sânge și un mediu lactozat semiselectiv (ca de pildă Mac Conkey) sau un mediu cromogen care evidențiază prin culori diferitele tipuri de bacterii implicate în etiologia ITU.

Urina se însămânțează ca atare cu 2 anse calibrate de 1, respectiv 4 mm. Primei anse îi corespunde o cantitate de 0,001 ml, iar celei de-a doua, 0,01 ml. Urina însămânțată este diseminată prin tehnica coloniilor izolate. Însămânțarea unor cantități fixe este obligatorie pentru a putea aprecia numărul de germeni pe ml de urină, număr care este hotărâtor în stabilirea unei infecții urinare (peste 100.000 germeni/ml sau peste 10⁵ UFC/ml). Cel mai frecvent agent etiologic al infecțiilor urinare este bacilul coli (*Escherichia coli*).

Dacă se suspectează o infecție cu germene pretențios (*Mycobacterium tuberculosis*), sedimentul se va însămânța pe medii speciale (Löwenstein-Jensen).

LCR se centrifughează și însămânțarea se face din sediment cu ajutorul ansei bacteriologice. Se utilizează o placă cu geloză-sânge și una de geloză-chocolat incubate în microaerofilie, iar cealaltă în anaerobioză. Se diseminează în striuri dense, distanțându-ne de zona în care s-a făcut descărcarea inoculului. După incubare 24 ore la 37°C se obțin colonii izolate.

Bacteriile pe care le găsim mai frecvent sunt *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* etc.

Lichidele seroase (pleural, pericardic, ascitic, sinovial). Sedimentul obținut după centrifugare se însămânțează în bulion steril și pe geloză-sânge și se incubează în microaerofilie. Pentru bacilii anaerobi nesporulați și pentru streptococii anaerobi este necesară o incubare în anaerobioză timp de cel puțin 3 săptămâni.

Germenii mai des întâlniți sunt *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* etc.

Puroiul. Se descarcă tamponul sau ansa încărcată cu o mică cantitate de puroi (dacă acesta s-a recoltat într-un recipient) pe 2 plăci cu geloză-sânge (una se incubează în aerobioză și una în microaerofilie), medii selective (cu antibiotice), geloza-sânge-chocolat și pe mediul Sabouraud pentru izolarea fungilor.

Secreția conjunctivală. Însămânțarea tampoanelor conjunctivale se face pe geloză-sânge, incubarea făcându-se în microaerofilie (pentru izolarea *Haemophilus* spp, *Neisseria* spp, *Str. pneumoniae*). Alți germeni care pot fi izolați sunt *Pseudomonas* spp, enterobacterii, streptococi hemolitici, *S.aureus*.

8.2. Cultivarea produselor biologice provenite din sedii populate cu floră normală

Exudatul faringian. Germenii care dau cel mai frecvent faringite sunt *Str. pyogenes* și *Staphylococcus aureus*. Ei se dezvoltă optim pe geloză sânge.

Pentru izolarea *Str. pyogenes* tamponul faringian se însămânțează pe mediu de îmbogățire Pick (cu azid de sodiu și cristal violet) iar după 24 h de termostatare la 37°C, pe geloză-sânge și se incubează în anaerobioză cu adaos de 10% CO₂. Streptococii beta hemolitici grup A și *Str.pneumoniae* cresc uneori mai bine în anaerobioză decât în aerobioză. Este bine să se însămânțeze exudatul și pe o geloză-chocolat pe care se dezvoltă speciile de *Haemophilus* și *Neisseria*.

Dacă medicul clinician are în vedere izolarea altor germeni decât cei obișnuiți el trebuie să specifice clar acest lucru în buletinul de analiză.

Exudatele nazale se însămânțează pe geloză-sânge și geloză-chocolat, se incubează în aerobioză cu adaos de 5% CO₂ pentru izolarea *N. meningitidis*, *Str.pneumoniae*, *Haemophilus* spp. și *Staphylococcus aureus*.

Exudatele otice. Se însămânțează pe aceleași medii ca și exudatul faringian, precum și pe medii lactozate. Germenii pe care îi întâlnim mai des sunt *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. etc.

Aspiratele bronșice. Germenii care se pot izola cel mai frecvent din aceste produse patologice sunt: *Str. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus* spp.etc.

Pentru izolarea *N. meningitidis*, însămânțarea se face imediat pe geloză-sânge-chocolat și incubarea are loc în aerobioză cu adaos de 10% CO₂.

Pentru izolarea bacililor Gram negativi (*Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp.), din aspirate ale pacienților spitalizați și intubați, însămânțarea se face pe medii lactozate sau cromogene.

Produse patologice recoltate de la nivelul cavității bucale în caz de ulcerării, abcese dentare urmăresc izolarea *Str. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Pentru izolarea stafilococilor și a streptococilor, însămânțarea se face pe geloză-sânge iar pentru *C. albicans* se folosește mediul Sabouraud.

Sputa. Prin însămânțarea sputei se urmărește izolarea *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *M. tuberculosis* și mai rar *Legionella pneumophila*.

Înainte de însămânțare, sputa se spală de trei ori succesiv cu ser fiziologic steril sau se lichefiază cu o soluție de N-acetil-L-cisteină (lichefierea se produce în 30 min la temperatura camerei). Sputa se va însămânța pe geloză-sânge pentru izolarea *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, pe geloză sânge chocolat pentru *Haemophilus influenzae* (incubare în aerobioză cu 5-10% CO₂) și pe mediul Löwenstein-Jensen pentru *M. tuberculosis* (culturile se incubează la 37°C și se vor urmări săptămânal timp de 2-4 săptămâni).

Vomismențele se însămânțează pe geloză-sânge ce vor fi incubate în aerobioză, respectiv în anaerobioză (pentru izolarea *S. aureus*) și pe medii selective pentru *Salmonella* și *Shigella*.

Materiile fecale. Pentru izolarea salmonelilor, shigelei și a altor enterobacterii, materiile fecale se însămânțează pe medii selective lactozate.

Pentru izolarea speciilor de *Campylobacter* se utilizează geloza-sânge cu adaos de polimixină, vancomicină și trimetoprim. Plăcile se incubează în anaerobioză la 42°C.

Pentru izolarea *V. cholerae*, se suspendă 2 ml materii fecale în apă peptonată la pH 9, se însămânțează pe mediul TCBS (thiosulfat-citrat-bilă sare-zaharoză-agar) și se incubează la termostat timp de 5 ore.

Pentru izolarea patotipurilor diareigene de *E.coli* însămânțarea se face pe medii speciale.

Secreția cervicală. Germenii mai frecvent izolați în infecții cervicale sunt: *N.gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*. Tampoanele recoltate se însămânțează pe 2 plăci cu geloză-sânge și pe medii selective (cu antibiotice). O placă cu geloză-sânge și cele cu mediu selectiv se incubează în aerobioză cu adaos de 5-10% CO₂ iar cea de-a doua placă cu geloză-sânge în anaerobioză cu adaos de 10% CO₂. Se poate utiliza și geloza-sânge-chocolat. Cele mai multe tulpini cresc după 48 ore de incubare. Însămânțarea se face și pe mediul Sabouraud pentru izolarea *C. albicans*.

Secreția conjunctivală. Însămânțarea tampoanelor conjunctivale se face pe geloză-sânge, incubarea făcându-se în aerobioză cu adaos de 5-10 % CO₂ (pentru izolarea *Haemophilus* spp, *Neisseria* spp, *S. pneumoniae*). Pentru izolarea *Moraxellei* se utilizează mediul Löeffler. Alți germeni care pot fi izolați sunt *Pseudomonas* spp, enterobacterii, streptococi hemolitici, *S. aureus*, *Chlamydia trachomatis*.

9. Identificarea germenilor pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, culturale, testelor biochimice, testelor de patogenitate

Metode de identificare a bacteriilor

După izolarea bacteriilor în cultură pură (cultură cu o singură specie microbiană), etapa următoare a diagnosticului bacteriologic este identificarea, care se face numai pe culturi tinere.

Identificarea preliminară a bacteriilor cu importanță medicală se face pe baza câtorva caractere:

- caractere morfo-tinctoriale pe frotiuri colorate Gram
- caractere culturale
- caractere biochimice, teste de patogenitate
- reacții Antigen-Anticorp

9. 1. Metode de identificare a bacteriilor pe baza caractere morfo-tinctoriale pe frotiuri colorate Gram

Constă în efectuarea frotiurilor din cultură și recunoașterea bacteriilor pe baza caracterelor morfologice (coci, bacili, cocobacili, spirochete) și tictoriale (Gram pozitive/negative). Aceasta etapă de identificare este importantă întrucât deseori caracterele culturale nu sunt concludente (forma, dimensiunea coloniilor, pigmentogeneza, proprietățile hemolitice pot fi uneori modificate, în special în cazul produselor provenite de la pacienți aflați pe antibioterapie).

9.2. Metode de identificare a bacteriilor pe baza caracterelor culturale

După incubarea culturilor (majoritatea 24 h la 37°C) și identificarea pe baza caracterelor morfo-tinctoriale pe frotiuri colorate Gram, urmează identificarea pe baza caracterelor culturale:

- **caractere culturale pe medii lichide:** valoare diagnostică o au numai acele medii care sunt selective pentru o specie și/sau indică un caracter biochimic evident prin modificări caracteristice.
- **caractere culturale pe medii solide** interesează:
 - *dimensiunea coloniilor:* mari (stafilococi, enterobacterii), mici (enterococii), pulverulente (streptococii).
 - *forma coloniilor:* rotunde (stafilococi, streptococi, gonococi, bacilul piocianic), ondulate (bacilul cărbunos), în “floare de margaretă” (bacilul difteric tipul gravis).
 - *marginile:* regulate (stafilococi, streptococi, bacilul coli, bacilul piocianic), neregulate cu prelungiri (*B.anthraxis*, *M.tuberculosis*, *C.diphtheriae* cu coloniile “R”).
 - *opacitatea* (colonii mucoide de stafilococi) sau transparența (coloniile la streptococul beta hemolitic sau bacilul piocianic).
 - *relieful:* bombat, mamelonat, ombilicat, aplatizat
 - *dacă colonia este de tip “S” sau “R”.* Aceeași tulpină se poate prezenta sub 2 forme de colonii: “S” care sunt netede, bombate, cu margini regulate, neemulsionabile în ser fiziologic și “R”, cu margini neregulate, suprafață rugoasă și care aglutinează spontan în ser fiziologic.
 - *aspectul:* mucos (colonii de *Klebsiella* spp), picătură de rouă (gonococ, meningococ).
 - *prezența de pigment:* alb (*Staphylococcus epidermidis*), auriu (*Staphylococcus aureus*), citrin (*Staphylococcus saprophyticus*), verzui (*Pseudomonas*).
 - *consistența:* apoasă (colonii matt și colonii glossy la streptococul beta hemolitic), mucoasă (colonii de *Klebsiella* spp).
 - *modul în care se detașează de pe mediu:* ușor (colonii de tip „S”), greu (colonii de tip „R”)
 - *mirosul:* de flori de salcâm (*Pseudomonas aeruginosa*), fetid (*Proteus*), drojdie de bere (*Candida* sp.).
 - *modificarea mediului prin:* hemoliză dacă mediul conține sânge (colonii hemolitice pe geloză sânge: *S.aureus*, streptococii, bacilul piocianic); *virarea culorii mediului* prin fermentarea unor zaharuri din conținutul lui (colonii lactozo-pozitive: bacilul coli, *Klebsiella* spp, colonii lactozo-negative: *Proteus*, *Salmonella*, colonii manito-pozitive: *S.aureus*).

Identificarea pe baza caracterelor culturale este deseori orientativă și trebuie confirmată prin alte teste mai precise.

9.3. Metode de identificare a bacteriilor pe baza testelor biochimice și testelor de patogenitate

- **secreția unor enzime** (coagulaza, catalaza, oxidaza, lecitinaza) care pot fi detectate prin teste simple;
- **capacitatea de metabolizare a zaharurilor** prin mecanism oxidativ sau fermentativ este una din posibilitățile cel mai des utilizate de identificare a bacteriilor. Deosebirea dintre bacteriile fermentative și cele nefermentative este importantă în identificarea bacililor gram negativi (enterobacterii care fermentează glucoza, versus non-fermentativi, care nu o fermentează);
- **utilizarea ca sursă de carbon** a unui set de substraturi pentru creștere (citrat, malonat etc.);
- **producerea de hidrogen sulfurat** care, în prezența unor metale grele din mediu, dă o culoare neagră (*Salmonella* spp, *Proteus* spp. etc.)

În practica curentă se utilizează medii multitest, ca de pildă, **galeriile API**, pe care se pot urmări concomitent mai multe reacții biochimice. După înocularea manuală cu cultură bacteriană a acestor galerii, se incubează 24 h la 37°C, după care se citesc, interpretarea lor și respectiv identificarea bacteriilor efectuându-se pe baza unor coduri numerice care se compară cu cele existente în tabelele furnizate de firma producătoare, care conțin “modelele” biochimice ale diverselor specii bacteriene.

În ultimul timp s-au dezvoltat **analizoare automatizate și computerizate** care utilizează carduri de reacții miniaturizate, cititoare automate și o bază de date care permite identificarea corectă a bacteriilor (analizor Vitek®, Microscan® etc.) sau spectrometre de masă de tip MALDI-TOF®.



Figura 16: VITEK® 2 COMPACT - sistem automatizat de identificare și testare a sensibilității

9.4. Metode de identificare a bacteriilor pe baza testelor moleculare

Identificarea ideală este pe baza structurii ADN-ului bacterian, prin **teste de biologie moleculară** (PCR) dar deocamdată, datorită prețurilor ridicate nu intră în rutina laboratoarelor.

Uneori este necesar să se demonstreze prezența unor factori de patogenitate ai bacteriilor identificate pentru a confirma diagnosticul clinic (de pildă, secreția unor toxine).

Nu întotdeauna testele biochimice duc la o identificare satisfăcătoare, diagnosticul fiind completat prin **reacții imunologice de tip antigen-anticorp** (aglutinare, imunofluorescență, RIA, Elisa etc.). Astfel în cazul salmonelelor, de pildă, testele biochimice ne conduc până la nivelul de gen. Identificarea serotipului de *Salmonella* se face pe baza structurii antigenice utilizând seruri aglutinante standard (reacții de aglutinare pe lamă). La sfârșitul acestei etape vom putea identifica bacteria la nivel de gen și specie, în unele cazuri chiar la nivel de grup sau tip.

10. Antibiograma, tehnică și citire interpretativă

Antibiograma este una din cele mai importante etape ale diagnosticului bacteriologic. De corectitudine, acuratețea și rapiditatea validării rezultatului putând depinde deseori viața pacientului aflat în stare critică. Un tratament antibiotic adecvat, mai ales în spitale, este esențial nu numai pentru sănătatea individului, ci și pentru a asigura o utilizare cât mai îndelungată a respectivului agent antimicrobian.

Alegerea agentului antimicrobian nu depinde exclusiv de rezultatul antibiogramei, problema fiind mult mai complexă. Trebuie luați în considerare și o serie de alți factori, cum sunt sediul infecției, vârsta pacientului, afecțiunile sale intercurente, statusul imunologic și nu în ultimul rând funcția renală și hepatică.

Testarea sensibilității germenilor microbieni la chimioterapice poartă denumirea de antibiogramă.

In vitro relația antibiotic-bacterie este definită prin:

- concentrația minimă inhibitorie (CMI) care reprezintă cantitatea cea mai mică de antibiotic ce inhibă complet multiplicarea unei tulpini bacteriene și
- concentrația minimă bactericidă (CMB) ce reprezintă cea mai mică cantitate de antibiotic capabilă să omoare 99,9-100% din indivizii unei tulpini testate.

In vivo, relația antibiotic-bacterie se exprimă prin concentrația de antibiotic activ în focarul de infecție, condiționată de difuzia acestuia în focar, inactivarea suferită de antibiotic prin fixare pe substraturi proteice, funcția de detoxifiere hepatică și renală, viteza de eliminare a antibioticului.

Pentru necesitățile terapeutice curente definim o bacterie ca fiind:

- **sensibilă**, dacă CMI este de minimum 2-4 ori mai mică decât nivelul mediu al antibioticului în focarul infecțios (sânge, bilă, LCR etc.). Efectul terapeutic este posibil prin utilizarea unor doze uzuale dintr-un asemenea antibiotic;
- **rezistentă**, atunci când CMI este mai mare decât nivelul mediu al antibioticului în focar. Efectul terapeutic nu se obține. În acest caz antibioticul determină efecte toxice pentru pacient înainte de a atinge CMI;
- **intermediară, sau moderat sensibilă**, atunci când CMI este apropiat de concentrația medie a antibioticului în focar. În acest caz efectul terapeutic se obține doar prin administrarea unor doze mari de antibiotic, sau prin administrare locală.

Rezistența bacteriilor la antibiotice poate fi:

- **naturală**, care se referă la un caracter de specie, absolut, determinat genetic, și
- **dobândită**, care se manifestă doar la un număr mai mare sau mai mic de tulpini din cadrul unei specii natural sensibile la un anumit antibiotic. Numărul tulpinilor cu rezistență dobândită este în continuă creștere, fiind determinat de o serie de mecanisme biochimice și genetice.

Spectrul antimicrobian al unui antibiotic reprezintă totalitatea speciilor microbiene cu toate sau aproape toate tulpinile sensibile la acest antibiotic.

Spectrul natural cuprinde toate speciile bacteriene sensibile la un antibiotic în momentul introducerii acestuia în terapie. Cunoașterea acestui spectru este deosebit de importantă pentru cazurile în care nu există posibilitatea efectuării unei antibiogramme, medicul practician fiind nevoit să aleagă un antibiotic la care respectivul germen să fie în mod natural sensibil.

Spectrul actual de sensibilitate este mai restrâns decât cel natural și cuprinde tulpinile microbiene sensibile la un anumit antibiotic, la un moment dat, într-o anumită zonă limitată (colectivitate), depinzând în mare măsură de antibioticele utilizate mai frecvent în respectiva zonă sau colectivitate. Restrângerea acestui spectru este pe zi ce trece tot mai accentuată, deoarece în timpul scurs de la introducerea antibioticului în terapie are loc apariția de noi și noi tulpini rezistente.

Antibiotic de rezervă este antibioticul cu utilizare în mod deliberat restrânsă, doar în infecții bacteriene grave, până la aflarea rezultatului antibiogrammei (în secțiile cu risc) sau în situația în care bacteria infectantă este multirezistentă la antibioticele uzuale (cazul tulpinilor de spital). Medicul bacteriolog are sarcina nu numai de a identifica și testa sensibilitatea germenilor, dar este implicat și în comisia de antibiotice a spitalului, cu rol în supravegherea tratamentului antiinfecțios.

10.1. Tehnica antibiogrammei

Antibiograma se obține prin cultivarea germenului testat *in vitro*, în condiții standard, în prezența unei cantități cunoscute de antibiotic. Antibioticele care fac parte din trusa cu care se face testarea se selecționează în funcție de spectrul natural de activitate al bacteriei testate și de localizarea focarului infecțios.

În situații deosebite, în care viața pacientului este în pericol, se poate efectua în paralel antibiograma primară direct pe produsul patologic, pentru a putea indica rapid un chimioterapic eficace (după antibiograma efectuată pe cultura pură, tratamentul putând fi corectat).

În România, sunt utilizate două standarde pentru antibiogramă: cel european - EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) și cel american - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Din punct de vedere tehnic există, în principiu, două posibilități de testare a activității antibacteriene: metoda diluțiilor și metoda difuzimetrică.

Ca martori pentru controlul testării se folosesc tulpini microbiene de referință care își păstrează nealterată sensibilitatea naturală la antibiotice (de exemplu, *S. aureus* ATCC 25293 atunci când testăm bacterii gram pozitive și *E. coli* ATCC 25922 atunci când testăm bacterii gram negative).

10.1.1. Metoda diluțiilor

Metoda diluțiilor are o utilizare mai restrânsă și este folosită mai ales în cercetare. Ea este pretențioasă din punct de vedere tehnic și necesită un consum mare de materiale care depășește necesitățile unui laborator clinic. Permite, însă, stabilirea precisă a CMI și CMB.

Determinarea CMI

Indicații:

- infecții grave care amenință viața bolnavului (septicemii, endocardite subacute, meningite),
- testarea bacteriilor cu cultivare lentă (bacilul Koch),
- testarea preliminară determinării CMB.

Principiu: se realizează diluții crescânde de antibiotic în mediu lichid, care se pun în contact cu cantități fixe din cultura microbiană de cercetat, se incubează 18 ore la 37°C și se controlează apoi care este cea mai mică concentrație de antibiotic ce nu a permis creșterea germenilor microbieni. Aceasta va fi CMI.

Determinarea CMB

Indicații: infecții grave de tipul septicemiilor, endocarditelor etc.

Principiu: după citirea CMI-ului se trece o cantitate fixă din eprubetele în care microorganismul nu a crescut pe un mediu de cultură solid lipsit de antibiotice. Se incubează 18 ore la 37°C, după care se notează care este concentrația la care au crescut germenii, precum și cea mai mică concentrație la care aceștia nu au mai crescut (au fost iremediabil distruși). Această din urmă diluție reprezintă CMB.

10.1.2. Metoda difuzimetrică

Aceasta se efectuează pe mediu solid, tehnica cea mai utilizată (adoptată în mod oficial de SUA din 1966) fiind tehnica Kirby-Bauer.

Indicații: numai pentru bacterii cu creștere rapidă. Permite testarea mai multor antibiotice pe aceeași placă, dar gradul de corelație reală cu CMI este de numai 70-90% .

Principiu: constă în însămânțarea tulpinii de cercetat pe suprafața unui mediu solid și aplicarea de microcomprimate de antibiotice pe suprafața mediului (acestea vor difuza în mediu din aproape în aproape atingând concentrații tot mai mici pe măsura creșterii distanței). Bacteriile vor crește “în pânză” pe suprafața mediului până în zona unde, în momentul multiplicării lor antibioticele vor atinge o concentrație corespunzătoare CMI. După o termostatare de 18 ore se apreciază sensibilitatea germenului în funcție de diametrul zonei de inhibiție care apare în jurul comprimatului de antibiotic.

Tehnica. Materiale necesare:

- mediu de cultură (Mueller Hinton sau Mueller Hinton suplimentat cu sânge pentru bacteriile pretențioase nutritiv),

- germeul de testat, care trebuie să fie în cultură pură de 18-24 de ore pe un mediu neselectiv (este contraindicată efectuarea antibiogramelor dintr-o cultură microbiană mixtă). Mărimea inoculului în ser fiziologic steril este standardizată la 0,5 Mc Farland (aproximativ 10⁸ germeni/ml).
- substanțele antimicrobiene se prezintă sub forma unor microcomprimate, având pe ambele fețe simbolul antibioticului și concentrația.

Trusele cu microcomprimatele utilizate se aleg în funcție de germeul testat (Gram-pozitiv sau Gram-negativ), de rezistența naturală a acestuia, dar și de localizarea infecției.

Modul de lucru: Suspensia bacteriană standardizată, obținută prin suspendarea în ser fiziologic steril a 2-3 colonii din cultura de 24 ore, este depusă pe suprafața mediului cu un tampon de vată steril (tamponul se scufundă în suspensie, se îndepărtează excesul prin presare de pereții tubului și se trece pe suprafața mediului în trei direcții până la acoperirea întregii suprafețe, efectuându-se și un striu marginal circular pentru a se obține un inocul uniform). După inoculare, plăcile se lasă 5 minute la temperatura camerei pentru a facilita absorbția inoculului în mediu, după care se depun microcomprimatele respectându-se distanța de minim 25 mm dintre discuri și 15 mm de marginea plăcii Petri. Plăcile astfel pregătite se incubează timp de 24 de ore la 37°C.

Interpretarea rezultatelor. După termostatare, citirea se efectuează prin măsurarea, cu ajutorul unei rigle, a diametrelor zonelor de inhibiție.

Corelația dintre diametrele zonelor de inhibiție și sensibilitatea germeului se face prin comparare cu datele existente în tabelele standardelor EUCAST sau CLSI. Rezultatele se exprimă în sensibil, rezistent și intermediar sensibil.

10.1.3. Testul E

Este o variantă de antibiogramă pe mediu solid, care permite stabilirea precisă a CMI.

Principiu: pe suprafața mediului de cultură gelificat și înșămânțat de aceeași manieră cu cea descrisă la metoda difuzimetrică se aplică în locul microcomprimatelor de antibiotice fâșii de hârtie de filtru impregnate cu antibiotic în concentrație crescândă. La un capăt al fâșiei concentrația este minimă, iar la celălalt este maximă. Interpretarea zonei de inhibiție permite aflarea CMI.

Cunoscând CMI pentru antibioticele la care un germene este sensibil, concentrația maximă în focar care se poate realiza și capacitatea de difuzie a antibioticului în focarul infecțios, se va putea alege varianta optimă de tratament.

Există și situații în care această metodă este singura recomandată, de CLSI sau EUCAST, pentru testarea sensibilității, ca de exemplu:

- testarea sensibilității la Vancomicină a stafilococilor,
- testarea sensibilității la Ceftriaxon a pneumococilor,
- testarea sensibilității la Colistin a bacililor Gram-negativi,
- testarea sensibilității la antibiotice pentru germeni anaerobi.

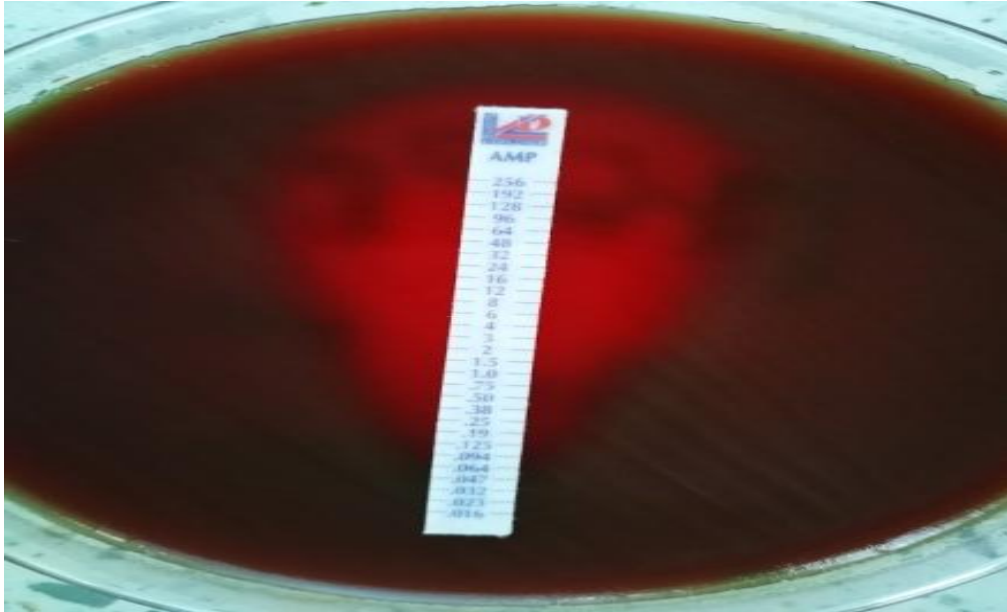


Figura 17: Test E la anaerobi

10.1.4. Teste utilizate pentru încadrarea tulpinilor în fenotipuri de rezistență

1. Sensibilitatea stafilococului la meticilină: stafilococul meticilino-rezistent (atât *S. aureus* - MRSA cât și coagulazo-negativ-MRSCN) reprezintă unul dintre cei mai importanți patogeni nosocomiali. Rezistența la meticilină presupune rezistență la betalactamine (inclusiv cefalosporine de generația I, II, III, IV și carbapeneme). Pentru depistarea acestui fenotip se folosește un singur agent antimicrobian – cefoxitinul, care este mai stabil decât meticilina la condițiile de conservare, permițând depistarea cu mai multă ușurință a speciilor rezistente. Conform standardelor CLSI și EUCAST, rezultatul testării la cefoxitin este raportat pentru oxacilină. În concluzie, pentru stabilirea meticilinorezistenței stafilococilor testarea se face cu cefoxitin, iar raportarea pentru oxacilină.

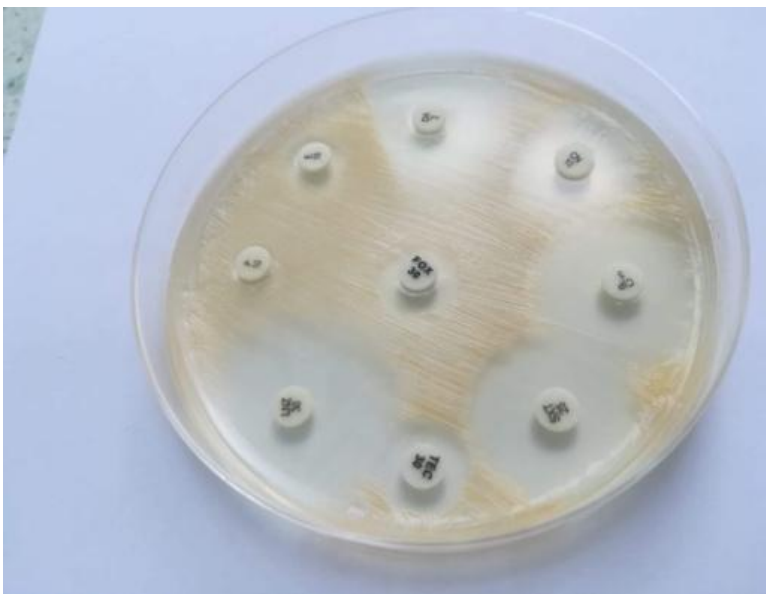


Figura 18: Metoda difuzimetrică - Mediul Mueller-Hinton, Stafilococul meticilino-rezistent - MRSA

2. Fenotipurile de rezistență prin secreția beta-lactamazelor de către bacili Gram-negativi:

- secreția de penicilază caracterizată prin rezistență la aminopeniciline și carboxipeniciline, posibil cu alterarea sensibilității și la ureidopeniciline și cefalosporinele de generația I sau II;
- secreția de cefalosporinază presupune rezistență la amino-, carboxi-, ureidopeniciline (inclusiv asociate cu inhibitori de beta-lactamaze), cefalosporine de generația I, II și III;
- secreția de beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE) determină rezistență la amino-, carboxi , ureidopeniciline, cefalosporine de generația I-IV și monobactami.

Pentru încadrarea tulpinilor în fenotipul secretor de beta-lactamază cu spectru extins se efectuează, ulterior interpretării rezultatelor antibiogramelor, testul de sinergie între amoxicilină+acid clavulanic (AMC) și ceftazidim (CAZ), cefotaxim (CTX), ceftriaxon (CRO) și aztreonam (ATM).

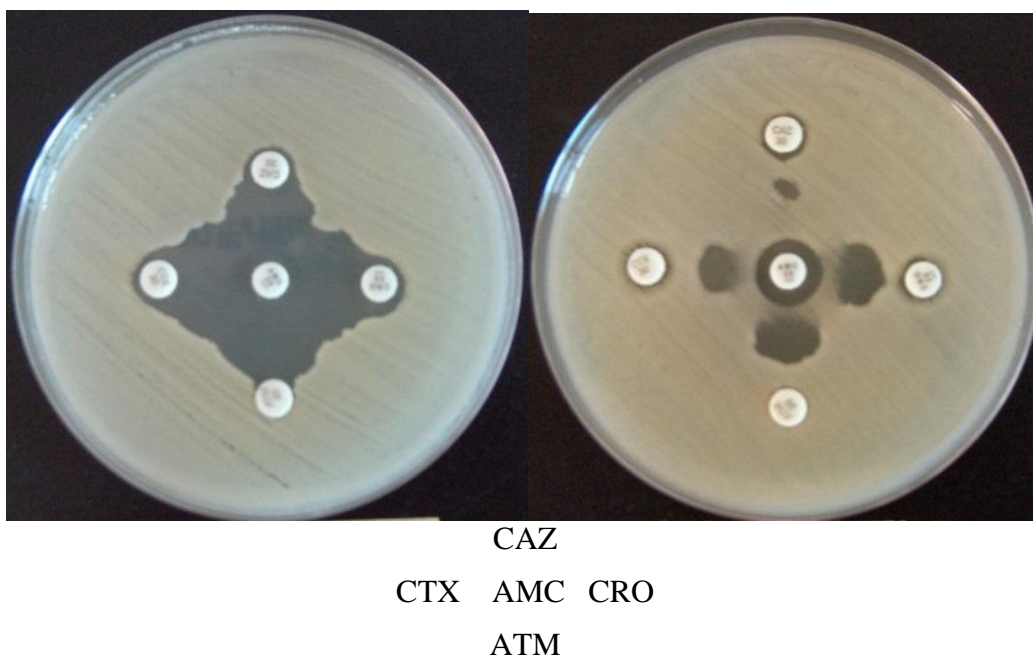


Figura 19: Imaginea sinergiei “în bușon de șampanie” între amoxicilină+acid clavulanic și cefalosporinele de generația a III-a și aztreonam

3. Fenotipuri de rezistență la macrolide, lincosamide și streptograme. Pentru determinarea fenotipurilor se utilizează microcomprimate de eritromicină și clindamicină.

- **Fenotipul MLSB inductibil** (fenotip MLSBi): rezistență la eritromicină și sensibilitate aparentă la clindamicină (care se va raporta rezistent). Pentru stabilirea acestui fenotip se urmărește imaginea de antagonism (zona D) între eritromicină (E) și clindamicină (DA) (Figura 20).
- **Fenotipul MLSB constitutiv**: rezistență la eritromicină și clindamicină.
- **Fenotipul M** (prin eflux): rezistență la eritromicină, păstrarea sensibilității la clindamicină.



Figura 20: Fenotipul MLSB inductibil

10.1.5. Determinarea sensibilității la antibiotice prin metode rapide și metode moleculare

Există în prezent analizoare automatizate și computerizate (analizor Vitek, Sensititre, Microscan etc.) care utilizează carduri de reacții miniaturizate, cititoare automate și o bază de date care permit efectuarea testelor de sensibilitate cu stabilirea CMI și interpretare fenotipurilor de rezistență.

De asemenea, dezvoltarea tehnicilor moleculare (Genexpert, PCR, RT-PCR etc.) au dus la introducerea tipizării genetice ca practică concomitentă sau alternativă la tipizarea fenotipică sau în vederea evidențierii genelor de rezistență la antibiotice: carbapenemaze (blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaOXA-48, blaIMP-1), gene de rezistență la vancomicină (van A, van B), la meticilină (mec A), sau a genei (Toxin B) pentru *C.difficile*.

Asocieri de antibiotice. Asocierile în terapie a două sau mai multe antibiotice au următoarele indicații:

- infecții care amenință viața bolnavului, până la venirea rezultatului antibiogramei,
- infecții mixte,
- pentru obținerea unor efecte sinergice prin care se poate depăși rezistența unei bacterii implicate în infecții grave sau pentru reducerea dozei unui antibiotic toxic,
- pentru prevenirea selecției de mutante rezistente pe parcursul unor infecții cronice (tuberculoza).

Efectul antimicrobian al asociațiilor de antibiotice poate fi:

- **sinergic**, atunci când efectul este semnificativ mai mare decât suma efectelor antibioticelor asociate (imaginea BLSE pe test de sinergie),
- **antagonist**, atunci când efectul asociației este semnificativ inferior față de al celui mai eficient antibiotic din asociație (zona D la fenotipul MLSBi).

Acest efect al asocierii antibioticelor în terapie poate fi verificat prin metoda difuzimetrică.

Se rețin următoarele reguli generale:

- este contraindicată asocierea aminoglicozidelor între ele sau cu polimixinele, datorită însumării efectelor toxice,
- este contraindicată asocierea antibioticelor bacteriostatice (tetraciline, macrolide) cu cele bactericide (peniciline, aminoglicozide) din cauza efectului antagonic,
- efecte sinergice au în general următoarele asocieri: trimetoprim + sulfamide (blochează secvențial o cale metabolică), penicilina + aminoglicozide (penicilina facilitează pătrunderea aminoglicozidelor la nivelul enterococilor, streptococilor de grup B), beta lactamine + aminoglicozide (primele permeabilizează membrana bacililor gram negativi pentru aminoglicozide), polimixine + trimetoprim (primele facilitează permeabilizarea tulpinilor de *Serratia* pentru sulfamide).

11. Reacții imunologice în diagnosticul de laborator al infecțiilor

Imunologia oferă laboratorului de microbiologie mijloace complexe de diagnostic care au la bază specificitatea dintre antigen (Ag) și anticorp (Ac).

Reacțiile antigen-anticorp. Cuplarea antigenului cu anticorpul omolog duce la formarea complexului ag-ac. Legarea efectivă dintre cei doi reactanți constituie **reacția primară** și este, de regulă, neobservabilă. Într-o fază următoare are loc **reacția secundară** care face vizibilă macroscopic reacția ag-ac prin fenomene fizice (aglutinarea complexelor imune, precipitarea lor) sau biologice (neutralizare, fixare a complementului). Starea fizică a antigenului este responsabilă de natura reacției secundare precum și de denumirea anticorpului corespunzător. Aceeași moleculă de anticorp poate fi descrisă, de fapt, prin fiecare din următorii termeni:

- aglutinine - produc agregarea antigenelor celulare de suprafață,
- lizinele - favorizează distrugerea membranelor celulare (cu participarea complementului),
- precipitinele - formează precipitate cu antigene solubile (de obicei proteine),
- antitoxinele - neutralizează exotoxinele bacteriene.

Aplicațiile practice ale reacției Ag-Ac se bazează pe specificitatea cuplării celor doi reactanți.

Reacțiile Ag - Ac sunt utilizate în diagnosticul de laborator al infecțiilor, atât ca metode directe de recunoaștere a microbilor sau a antigenelor lor în probele clinice sau în culturile izolate, precum și ca metode indirecte de evidențiere și titrare a anticorpilor specifici în serul pacienților.

Reacțiile ag-ac pot fi **calitative** (simpla detectare a ag sau ac) și **cantitative**. În reacțiile cantitative se determină titrul reactivului (ag-ului sau ac-ului). Acesta se exprimă printr-o fracție ordinară cu numărătorul 1 și reprezintă cantitatea reactivului cercetat.

Titrul este diluția maximă a unuia dintre reactivi la care mai este vizibilă reacția cu cantități constante și definite ale reactivului omolog.

11.1. Reacția de aglutinare

Reacția de aglutinare este o reacție ag-ac foarte sensibilă în care **antigenul este corpuscular** (bacterii, eritrocite sau particule de latex pe care s-au adsorbit antigene specifice). Anticorpul (aglutininele) reacționează cu antigenele de suprafață ale particulelor și determină într-o fază următoare aglutinarea lor, în grămezi vizibile cu ochiul liber.

11.1.1. Reacția de aglutinare directă, activă

Se petrece prin cuplarea unui ag. corpuscular aflat în suspensie cu ac. omolog. Aglutinatele formate se depun și lasă supernatantul limpede. Ag poate fi reprezentat de o suspensie bacteriană, respectiv de "corpi bacterieni" întregi, vii sau omorâți, precum și de hematii, leucocite etc.

Dacă antigenul este o bacterie ciliată, aglutinarea poate avea aspect macroscopic diferit, în funcție de sediul antigenelor implicate în reacție. Astfel, dacă antigenele sunt situate pe corpul bacterian, vorbim de **aglutinare somatică "O"**, care este grunjoasă, fermă și rezistă la agitare. Dacă antigenele se află pe flageli, are loc **aglutinarea flagelară "H"** cu aspectul unor fulgi de zăpadă care se desfac cu ușurință.

11.1.2. Reacția de aglutinare pasivă (indirectă)

Este o variantă a reacției de aglutinare care a apărut ca urmare a necesității de a evidenția antigene necorpusculare, care nu produc în mod normal o aglutinare macroscopic vizibilă. Aceste ag devin corpusculare prin adsorbția lor pe suprafața unor particule care joacă rolul unui suport material, inert din punct de vedere imunologic:

- latexul în latex aglutinare pasivă inversă,
- suspensia de hematii în hemaglutinarea pasivă inversă
- sau S.aureus în reacția de coaglutinare.

11.1.3. Tehnica reacțiilor de aglutinare

În funcție de complexul ag-ac studiat, reacțiile de aglutinare se pot efectua fie în tuburi, (tehnică mai laborioasă, dar care permite cuantificarea reacției), fie pe lamă (reacție mai rapidă, dar mai puțin sensibilă, care oferă doar relații calitative).

11.1.4. Aplicațiile practice

Reacțiile de aglutinare sunt utilizate atât în diagnosticul serologic pentru evidențierea anticorpilor necunoscuți în serurile de cercetat, prin intermediul antigenelor cunoscute, precum și în cel bacteriologic pentru identificarea bacteriilor cu ajutorul anticorpilor cunoscuți.

1. Reacțiile de serodiagnostic se efectuează în tuburi și se utilizează pentru titrarea anticorpilor din serul bolnavilor. Ele se aplică în infecțiile în care diagnosticul bacteriologic nu este întotdeauna concludent sau germeii sunt greu de cultivat, ca, de pildă, în serodiagnosticul febrei tifoide (analiza serică calitativă), al brucelozei (reacția Wright), al tifosului exantematic (reacția Weil-Felix) etc.

2. Reacțiile de diagnostic bacteriologic se efectuează pe lamă (excepțional în tuburi).

a. Reacțiile de aglutinare directe sunt rapide, mai puțin costisitoare și la îndemâna tuturor laboratoarelor și utilizează seruri imune ce conțin anticorpi. În diagnosticul microbiologic aceste reacții se folosesc la identificarea unor enterobacterii pe baza structurii antigenice (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogen). În principiu se pun în contact pe lamă seruri imune cunoscute cu tulpina de identificat. Pe baza serului cu care tulpina va aglutina se poate stabili cu ușurință identitatea tulpinii de cercetat.

b. Reacțiile de aglutinare pasivă

Latexaglutinarea pasivă este utilizată în diagnosticul serologic al unor infecții bacteriene (streptococice, cu *Treponema* etc.), parazitare (cu *Toxoplasma* etc.) și mai ales în numeroase infecții virale, datorită dificultății de cultivare a virusurilor.

Latexaglutinarea pasivă inversă: Există numeroase kit-uri comerciale, pe care laboratorul de microbiologie le utilizează în identificarea diversilor agenți patogeni pe baza structurii lor antigenice ca, de pildă, a grupului de streptococi, a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* etc.

Coaglutinarea este tot o aglutinare pasivă inversă bazată pe proprietatea proteinei A a *S. aureus* de a reacționa spontan cu fragmentul Fc al imunoglobulinelor și de a-l fixa la suprafața corpului bacterian. Se utilizează frecvent în identificarea diversilor agenți infecțioși.

În rutină a intrat determinarea grupelor de streptococi. Dacă anticorpii antistreptococi cunoscuți, specifici de grup se pun în contact cu proteina A a stafilococilor ei se vor lega în mod nespecific prin fragmentul Fc ocupat de proteina A. Fragmentele Fab rămase libere reacționează în mod specific cu streptococii din cultura microbială cercetată, permițând astfel identificarea grupului în raport cu serul care produce aglutinarea.

Prin latexaglutinare și coaglutinare se poate pune un diagnostic rapid prin **identificarea bacteriilor direct din produsul biologic** recoltat de la pacient. Acest aspect este important în meningite care pun în pericol viața pacientului.

Reacția de hemaglutinare pasivă. Are numeroase aplicații în virusologie și bacteriologie

În diagnosticul serologic al sifilisului, antigene extrase din tulpina de referință Nichols de *Treponema pallidum* sunt adsorbite pe suportul reprezentat de suspensia de hematii de berbec sau curcan și puse apoi în contact cu serul de cercetat. Prezența în ser a anticorpilor antitreponema duce la pozitivarea reacției.

11.2. Reacția de precipitare

Este o reacție antigen-anticorp care apare în urma punerii în contact a unui antigen solubil sau în stare coloidală cu anticorpul omolog. Complexul insolubil care se formează devine vizibil sub formă de precipitat.

Reacțiile de precipitare se utilizează în practica curentă pentru identificarea antigenelor necunoscute cu ajutorul anticorpilor omologi prezenți în seruri imune de referință, preparate pe iepure sau alt animal și mai rar în scop invers, pentru identificarea anticorpilor.

Antigenele din reacție (extracte bacteriene, filtrate de culturi microbiene sau oricare altă proteină) se numesc **precipitinogene**, iar anticorpii de care se leagă, **precipitine**.

Reacția de precipitare este deosebit de sensibilă (cantități infime de reactanți pot fi identificate) și are aplicații în diverse domenii: microbiologie, imunologie, imunochimie, medicina judiciară etc.

Reacțiile de precipitare se petrec în mediu lichid sau semisolid (gel).

11.2.1. Reacții de precipitare în gel

Se bazează pe proprietatea soluțiilor de antigen și anticorp de a difuza lent în mediu semisolid (gel de agar, agaroză, amidon, gelatină) și de a precipita vizibil sub formă de linii, arcuri sau inele în zonele în care se întâlnesc în proporție optimă (zone de echivalență).

Imunodifuzia dublă și bidimensională. Atât antigenii cât și anticorpii se depun la suprafața mediului în godeuri (Ouchterlony) sau difuzează unul spre celălalt din două benzi de hârtie îmbibate cu ac respectiv ag, așezate pe suprafața gelozei la distanță una de cealaltă (Elek).

Reactanții difuzează unul spre celălalt în mediu și precipită în locul de echivalență sub forma de linii sau arcuri. Este o metodă calitativă utilizată pentru caracterizarea antigenelor în amestec.

Prin tehnica Outcherlony se evidențiază în trecut antigenul HBs în serul pacienților suspecți de infecție cu virusul hepatitei B. Testul Elek se utilizează și astăzi la evidențierea toxinei bacilului difteric.



Figura 21: Testul Elek

11.3. Reacția de fixare a complementului (RFC)

RFC este o reacție ag-ac utilizată în diagnosticul serologic al multor infecții (bruceleza, leptospiroza, listerioza, sifilis) și se bazează pe proprietatea complexelor ag-ac de a fixa complementul, care nu va mai fi disponibil unui al doilea sistem ag-ac, sistemul indicator, format din hematii de oaie și ser antioaie.

RFC este utilizată pentru a detecta prezența de ac specifici în serul pacientului. Testul se bazează pe utilizarea complementului, un factor seric labil, care determină citoliza imună (adică liza celulelor pe suprafața cărora sunt fixați anticorpi).

Testul se bazează pe capacitatea complementului de a se activa în prezența complexelor antigen-anticorp și include următoarele etape:

- Se încălzește serul de testat la 56°C pentru a distruge complementul pacientului
- Se adaugă cantități cunoscute de complement și de antigen (antigenul care trebuie depistat prin detecția anticorpilor împotriva sa)
 - o Dacă serul conține anticorpi specifici împotriva antigenului respectiv, aceștia se vor lega la antigenul adăugat în etapa precedentă și vor forma un complex Ag-Ac a cărui prezență va activa complementul (de asemenea adăugat în etapa precedentă); se formează un complex Ag-Ac-complement (deci, complementul este fixat de complexul ag-ac)
 - o Dacă serul pacientului nu conține anticorpi specifici împotriva antigenului de cercetat, complementul rămâne liber (deoarece nu se formează complexul Ag-Ac)

- Pentru a evidenția una sau alta dintre cele două posibilități descrise mai sus (fixarea sau non-fixarea complementului), se adaugă un amestec de hematii de oaie plus anticorpi specifici anti-hematii de oaie
- În cazul unui test POZITIV (când serul pacientului conține ac împotriva ag de testat): complementul este fixat de complexul ag (microbian)-ac și nu va acționa împotriva complexului format de hematiile de oaie și ac împotriva acestora; ca urmare nu se va produce hemoliza (distrugerea hematiilor)
- În cazul unui test NEGATIV (când serul pacientului nu conține ac împotriva ag microbial de cercetat), nu are loc nicio reacție ag-ac și complementul rămâne liber (nefixat). Ca urmare, la adăugarea amestecului hematii de oaie plus ac anti-hematii de oaie, complementul liber se va fixa pe complexe de ag-ac (hematii-anticorpi anti-hematii) și va determina liza hematiilor ilustrată de colorația roz a tubului de reacție.

11.4. Reacții cu anticorpi marcați

Reacțiile cu ac marcați au fost introduse în scopul de a mări sensibilitatea și specificitatea reacțiilor ag-ac. Moleculele de ac pot fi marcate cu substanțe radioactive, fluorescente sau cu enzime și se utilizează în radioimunodozări, în imunofluorescență și respectiv în testele Elisa.

11.4.1. Imunofluorescența

Imunofluorescența (IF) se bazează pe folosirea ac conjugați chimic cu o substanță fluorescentă (fluorofor sau fluorocrom) cum ar fi izotiocianatul de fluoresceina (FITC – fluorescein isothiocyanate) pentru a evidenția un anumit ag (ag țintă). La examinarea cu microscopul cu fluorescență, fluoroforul permite vizualizarea ag țintă în proba biologică, sub forma de particule fluorescente.

IF directă folosește un singur ac anti-ag țintă (anticorp primar). Ac primar este conjugat direct cu un fluorofor, iar prezența ag țintă în proba de testat se va evidenția prin vizualizarea fluorescenței, ca urmare a fixării ac marcat cu fluorofor la antigenul țintă.

La ora actuală sunt disponibile seruri imune pentru identificarea multor microorganisme, ca de pildă: *Bordetella pertussis* și *parapertussis*, *Escherichia coli enteropatogen*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., leptospire, listerii, *Neisseria gonorrhoeae* și *meningitidis*, *Pseudomonas pseudomallei*, salmonele, shigele, stafilococi, pneumococi, streptococi de diverse grupe, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Candida albicans* etc. De asemenea se identifică și virusuri, cum sunt: Adenovirusuri, Herpesvirusuri, virusurile gripale, virusul rabic etc.

IF indirectă utilizează doi ac (primar = orientat împotriva ag țintă; secundar = orientat împotriva ac primar și marcat cu fluorofor). În cazul în care ag țintă este prezent în proba de testat, ac primar se va lega de acesta, iar ac secundar marcat cu fluorofor se va fixa la rândul lui de ac primar.

Această variantă a IF este utilizată în general pentru evidențierea anticorpilor într-un mediu biologic, ca de pildă ac anti-*Treponema pallidum* din ser, sau diagnosticul sediului unei infecții urinare (prin evidențierea complexelor ag-ac în urină, marker al infecțiilor urinare înalte).

11.4.2. Reacții imunologice cu anticorpi marcați cu enzime - Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Testele ELISA se bazează reacții ag-ac legate (conjugate) cu **reacții enzimă-substrat**, efectuate pe un suport solid (nitroceluloza).

Tehnologia ELISA utilizează două tipuri de substanțe de sinteză: CONJUGATUL (ac conjugată cu o enzimă) și SUBSTRATUL (substratul enzimei din conjugat).

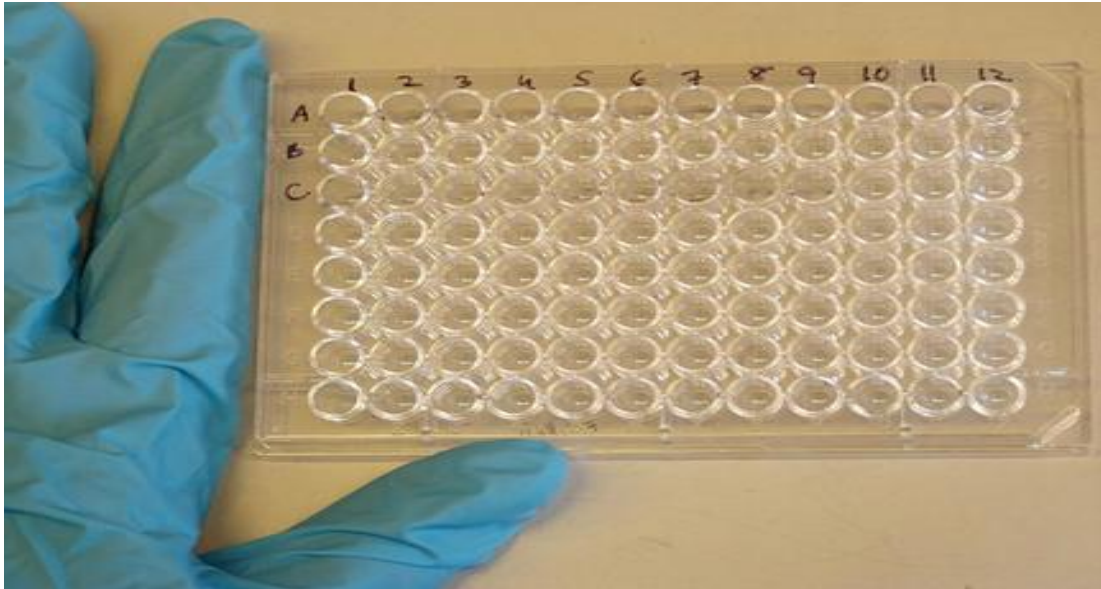


Figura 22: Suport solid pentru ELISA: placă din nitroceluloză cu 96 godeuri [https://www.thermofisher.com/Overview of ELISA]

Tipuri de ELISA: Direct; Indirect; "Sandwich"

ELISA direct – Etape:

De regulă analitul este un ag (viral, bacterian etc.). Se adaugă serurile de testat pe suportul solid (în godeurile plăcii). Se adaugă CONJUGATUL (anticorpi specifici **conjugăți cu o enzimă** - împotriva antigenului țintă); dacă serul conține antigenul țintă, anticorpii specifici din CONJUGAT se vor lega la acesta; dacă serul nu conține antigenul țintă nu se vor forma aceste legături și conjugatul adăugat va fi eliminat din godeu prin spălare;

Se adaugă SUBSTRATUL enzimei conținute în conjugat; în eventualitatea în care CONJUGATUL a rămas legat prin intermediul reacției ag-ac, atunci se va produce și reacția enzimă-substrat care se vizualizează printr-o reacție de culoare; apariția culorii relevă deci prezența complexului "antigen țintă + anticorp conjugat cu enzima + substrat al enzimei" = test POZITIV; în cazul în care serul nu conține ag țintă, la adăugarea conjugatului ac nu se vor lega și spălarea va îndepărta conjugatul din godeu iar substratul nu va intra în contact cu enzima și nu se va dezvolta reacția de culoare.

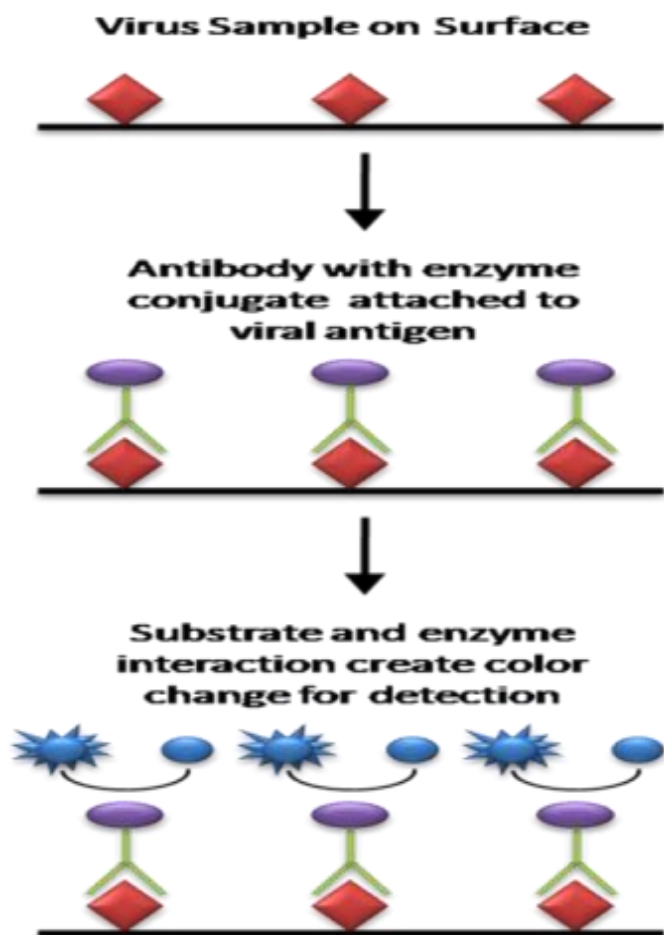


Figura 23: ELISA – test direct [<https://www.thermofisher.com/> Overview of ELISA]

ELISA indirect

De regulă analitul este un anticorp (anti-viral, anti-bacterian etc.).

Godeurile plăcii sunt tapetate (acoperite) din fabricație cu un antigen corespunzător anticorpilor de testat.

La adăugarea serului de testat, dacă acesta conține ac respectivi, aceștia vor reacționa cu ag care tapetează godeul și se vor forma complexe ag-ac; în cazul în care serul nu conține ac respectivi, nu se formează complexe ag-ac.

Se adaugă CONJUGATUL care conține ac anti-imunoglobulină umană (anticorpi “anti-anticorpi”) conjugați cu o enzimă; dacă serul a conținut ac de testat și s-au format complexe ag-ac, în etapa anterioară, adăugarea conjugatului va determina legarea ac anti-imunoglobulină umană la ac de testat (care au rămas în godeu legați de ag cu care este tapetat acesta din fabricație). Rezultatul este formarea unui complex “ag + ac seric + ac anti-imunoglobulină umană conjugat cu enzimă”

Acest complex este evidențiat la adăugarea substratului enzimei prin dezvoltarea reacției de culoare ceea ce relevă prezența anticorpilor de testat în serul pacientului.

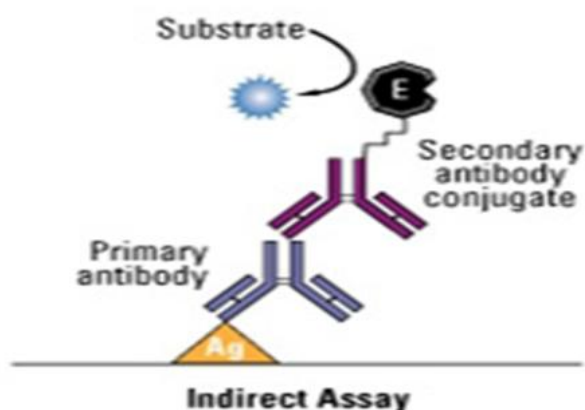


Figura 24: ELISA test indirect [<https://www.thermofisher.com/> Overview of ELISA]

ELISA tip “sandwich”

Analitul poate fi un ag sau un ac.

Dacă analitul este un antigen (viral, bacterian etc.) godeurile sunt pre-tapetate cu anticorpi “de captură” (specifici antigenului țintă).

La adăugarea serului, dacă acesta conține ag țintă, anticorpul “de captură” care tapetează godeul vor lega acest antigen. Se adaugă apoi anticorpi “de detecție” care se vor lega la antigenul deja fixat (“capturat”) de anticorpul care tapetează godeul. În această etapă, antigenul țintă este legat între cei doi anticorpi, ca într-un sandwich.

Se adaugă CONJUGATUL care conține anticorpi anti-anticorpi de detecție conjugați cu o enzima. La adăugarea substratului enzimei are loc reacția de culoare.

Dacă analitul este un anticorp, godeurile sunt pre-tapetate cu antigenul corespunzător, iar etapele se vor derula în mod similar. “Sandwich”-ul în acest caz este de tip “antigen-anticorp-antigen”.

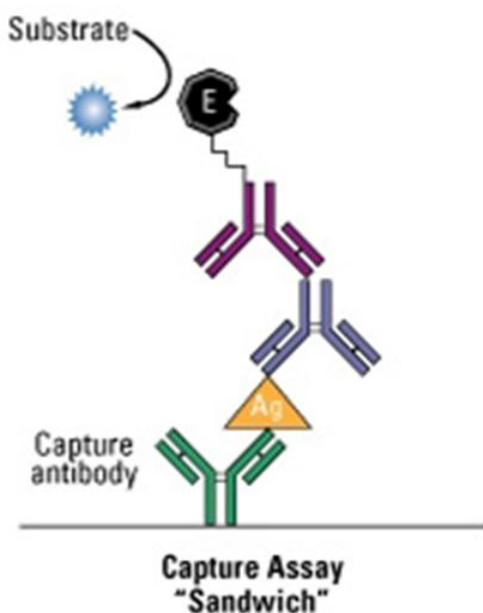


Figura 25: ELISA “sandwich” [<https://www.thermofisher.com/> Overview of ELISA]

Testele Elisa au ușurat și îmbunătățit enorm diagnosticul de laborator al infecțiilor, atât a celor bacteriene și micotice, dar mai ales virale (hepatitele virale sau infecția HIV).

11.4.3. Teste RIA (radioimmunoassay)

Testele radioimune utilizează antigene marcate radioactiv pentru a detecta prezența de anticorpi specifici. Nivelul de anticorpi se determină prin măsurarea radioactivității probei. În prezent, utilizarea acestor teste în diagnosticul infecțiilor virale a cedat teren în fața testelor de tip ELISA și WB, precum și a celor de biologie moleculară.

11.4.4. Teste “Western blot”

Aceste teste sunt, de obicei, utilizate pentru a confirma prezența de ac serici detectați prin ELISA. Tehnologia este similară celei utilizate de testele ELISA, implicând reacții ag-ac legate de reacții enzimă-substrat.

Proteinele din celule infectate cu agenți patogeni cunoscuți sunt separate prin electroforeză și fixate pe un suport solid (strip de nitroceluloză).

Serul de testat este pus în contact cu stripul și incubat. Dacă ac specifici sunt prezenți în ser, ei se vor lega la stripul de nitroceluloză la nivelul fracțiunilor proteice separate electroforetic. Se adaugă CONJUGATUL (ac anti-imunoglobulină umană conjugați cu o enzimă), iar după incubare se adaugă SUBSTRATUL enzimei. Benzile colorate care apar pe suprafața stripului de nitroceluloză indică prezența ac legați specific la fracțiunile proteice ale antigenului țintă.

Este metoda de referință în diagnosticul serologic în SIDA datorită sensibilității deosebite.

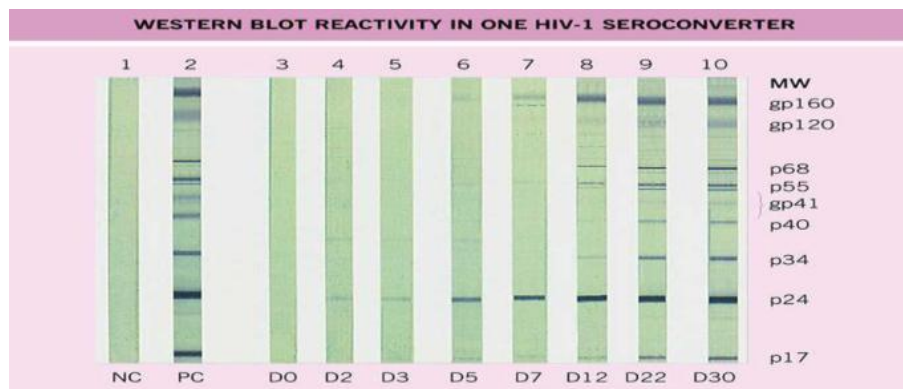


Figura 26: Western blot: stripuri de nitroceluloză cu benzi indicând prezența anticorpilor specifici împotriva fracțiunilor antigenice HIV (strip 1 = Control Negativ; strip 2 = Control Pozitiv; Stripurile 3-10 = probe de testat) [<https://microbeonline.com/laboratory-diagnosis-of-hiv-virus/>]

Aplicabilitatea testelor imunoenzimatică este foarte largă, incluzând o gamă variată de infecții bacteriene, virale, fungice etc. Determinarea de ag și/sau ac specifici împotriva agenților infecțioși, cu posibilitatea aplicării de teste diferențiate pentru clase de anticorpi specifici (IgM/IgG/IgE) reprezintă baza realizării profilurilor serologice sugestive atât pentru diagnosticul etiologic cât și pentru stadializare, evaluarea răspunsului imun sau a eficacității terapiei sau vaccinării.

12. Metode rapide de diagnostic în laboratorul de microbiologie.

12.1. Metode de diagnostic bazate pe identificarea acizilor nucleici

Metodele de diagnostic molecular sunt aplicabile pentru o gamă extrem de largă de infecții virale, dar și bacteriene, fungice etc. Față de multe dintre tehnicile imunoenzimatică care detectează prezența de ac specifici (diagnostic indirect), biologia moleculară oferă posibilitatea diagnosticului direct: detecția și identificarea de material genetic (ADN sau ARN) al agentului patogen.

Definiții relevante

1. Acizi nucleici: macromolecule lungi, liniare (polimeri) purtătoare de informație genetică; sunt compuși din nucleotide (monomeri) legate între ele. Fiecare nucleotid are 3 componente:

- un glucid cu 5 atomi de carbon (pentoza): dezoxiriboza în AND, riboza în ARN;
- un grup fosfat;
- o bază azotată (nucleobaza).

2. Nucleobaze: Compuși biologici azotați prezenți în structura nucleotidelor.

Baze azotate primare:

- Citozina (C); Guanina (G); Adenina (A) (prezente atât în ADN cat și în ARN);
- Timina (T) (doar în ADN);
- Uracil (U) (doar în ARN).

3. “Base pairing”: Perechile de baze se formează datorită complementarității i.e. A cu T; C cu G; acest fenomen stă la baza aspectului de dublu helix al ADN; structura ADN a fiecărei specii depinde de secvența nucleotidelor (succesiunea acestora în lanțul ADN reprezintă baza codului genetic)

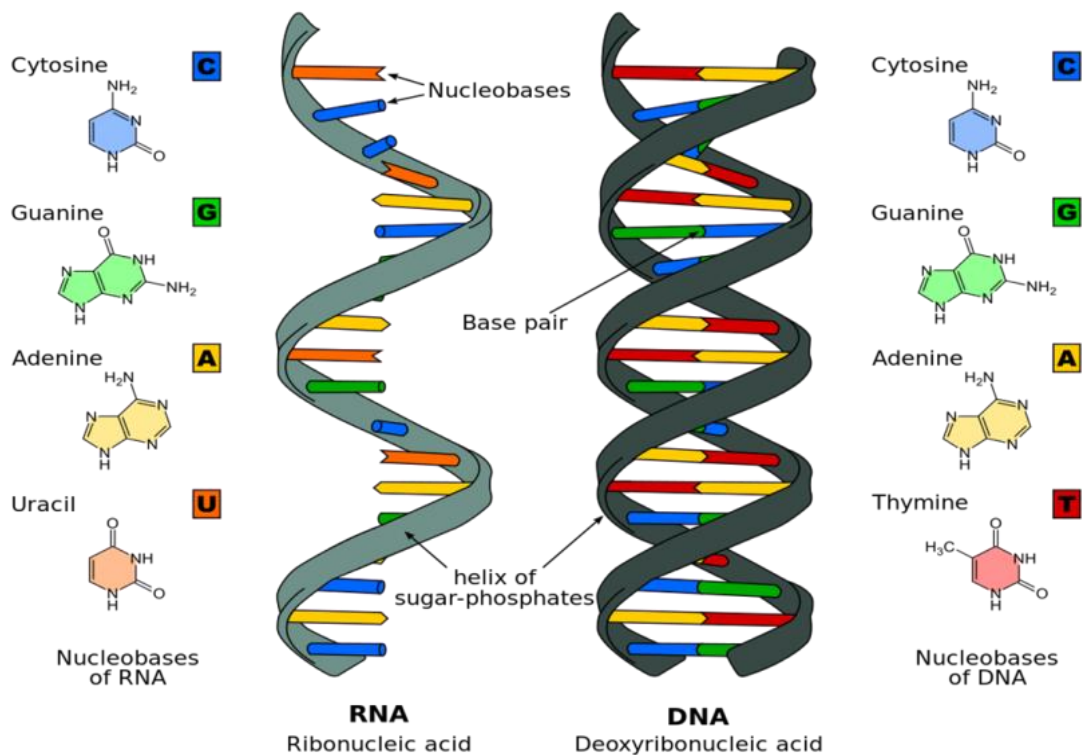


Figura 27: ARN și ADN: formarea legăturilor între bazele azotate, conform complementarității [https://www.thoughtco.com/dna-vs-rna-1224518 DNA vs. RNA. The Carriers of Genetic Information in Cell Reproduction, Heather Scoville, Updated July 24, 2017]

4. Polimeraze: enzime care catalizează reacțiile de polimerizare (ADN-, ARN-polimeraze)

5. Revers-transcriptaze: enzime care catalizează formarea ADN sau ARN utilizând drept tipar (matrița) un lanț de ADN / ARN preexistent

6. Replicarea semiconservativă a ADN: tip de replicare care implică următoarea succesiune de etape:

- a. Denaturarea: Separarea celor 2 lanțuri (catene) de ADN;
- b. Sinteza de noi catene ADN complementare prin procesul de “base pairing” (legarea bazelor azotate unele de altele pe baza complementarității)
- c. Ca rezultat apar 2 copii identice care conțin toată informația biologică din ADN-ul “parental”; moleculele ADN “fiice” sunt “jumătate vechi” și “jumătate noi” adică jumătate din ADN parental este salvată (conservată) în fiecare moleculă ADN “fiică”, ceea ce reprezintă replicarea semiconservativă a ADN

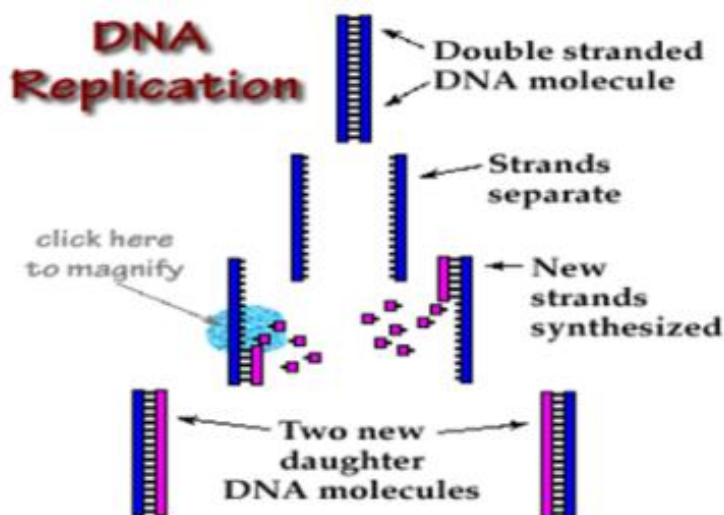


Figura 28: Replicarea semiconservativă a ADN

[<https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>]

7. Primer (amorsa): lanț de acid nucleic care servește ca punct de pornire pentru sinteza ADN sub acțiunea unei polimeraze

8. Sonda: segment ADN sau ARN marcat, folosit pentru a detecta o anumită secvență de nucleotide dintr-o moleculă ADN; sondele se sintetizează cu anumite secvențe complementare cu secvențe cunoscute din ADN-ul țintă (de exemplu al virusului de detectat)

Etapele PCR:

1. Extracția acidului nucleic (AN) din proba biologică; include etapele de:

- a. liza celulară pentru eliberarea AN viral/bacterian;
- b. eluție - procedeu chimic de dizolvare a substanțelor fixate pe un mediu absorbant, prin spălarea cu un amestec de solvenți adecvați
- c. filtrare.

2. Prepararea ”amestecului de reacție”:

- a. primeri specifici sintetizați astfel încât secvențele să fie complementare cu secțiuni din AN al virusului țintă;
- b. polimeraza care va cataliza polimerizarea;
- c. alte componente care vor facilita etapele următoare.

3. Adăugarea AN extras în “amestecul de reacție”

4. Ciclurile de amplificare: efectuate în așa-numite “thermal cyclers” (mașini PCR) = instrumente care realizează un control extrem de strict al temperaturii corelat cu schimbări foarte rapide de temperatură, în conformitate cu un profil termic predefinit (număr de cicluri de amplificare, temperatură și durata fiecărui ciclu).

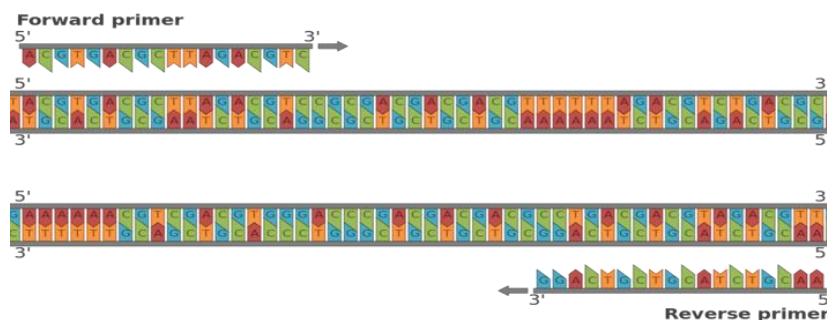


Figura 29: Strip cu tuburi de reacție PCR (stg.); Mașina PCR (thermocycler) (dr.)
 [https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction]

Ciclurile de reacții (în jur de 30-40 cicluri)

1. Denaturarea (la aproximativ 94 C): cele doua lanțuri ADN se separă și rezultă 2 catene (lanțuri) de ADN monocatenar
2. Etapa de “annealing” – refacerea unor porțiuni de ADN dublu catenar pe baza complementarității bazelor azotate (între 54 - 64 C): Primerii din amestecul de reacție găsesc secțiunile cu secvențe de baze azotate complementare pe fiecare dintre catenele ADN care au rezultat în urma denaturării și se leagă în pozițiile respective (Adenina la Timina; Citozina la Guanina)
3. Extensia (la aproximativ 72 C): Polimeraza din amestecul de reacție catalizează sinteza celor 2 noi catene ADN pornind de la nivelul primerilor fixați la cele două catene ADN inițiale, care s-au separat în etapa de denaturare.

Prin reluarea de 30-40 de ori a etapelor de mai sus rezultă o amplificare exponențială cu obținerea a milioane de copii ale AN extras în etapa inițială.



Polymerase chain reaction - PCR

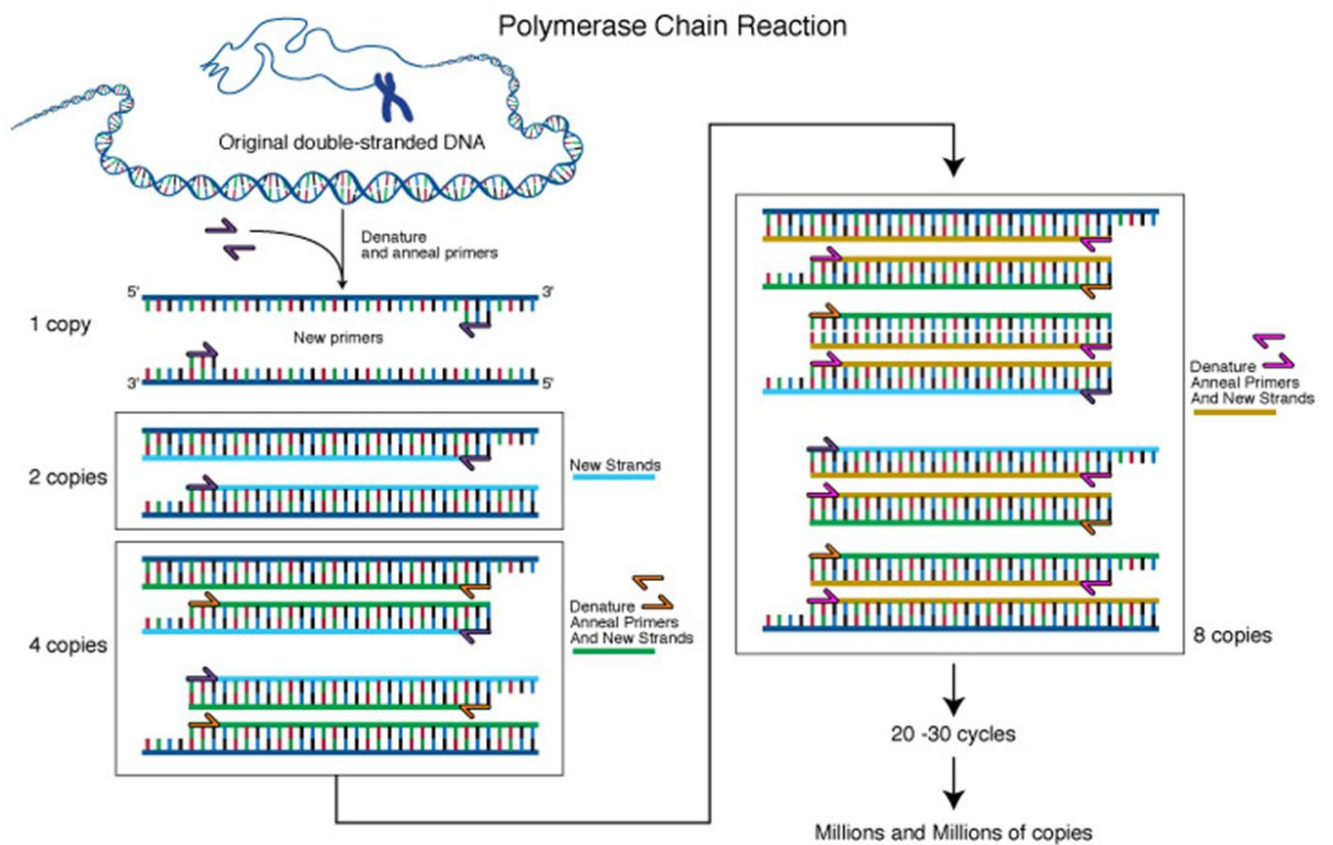
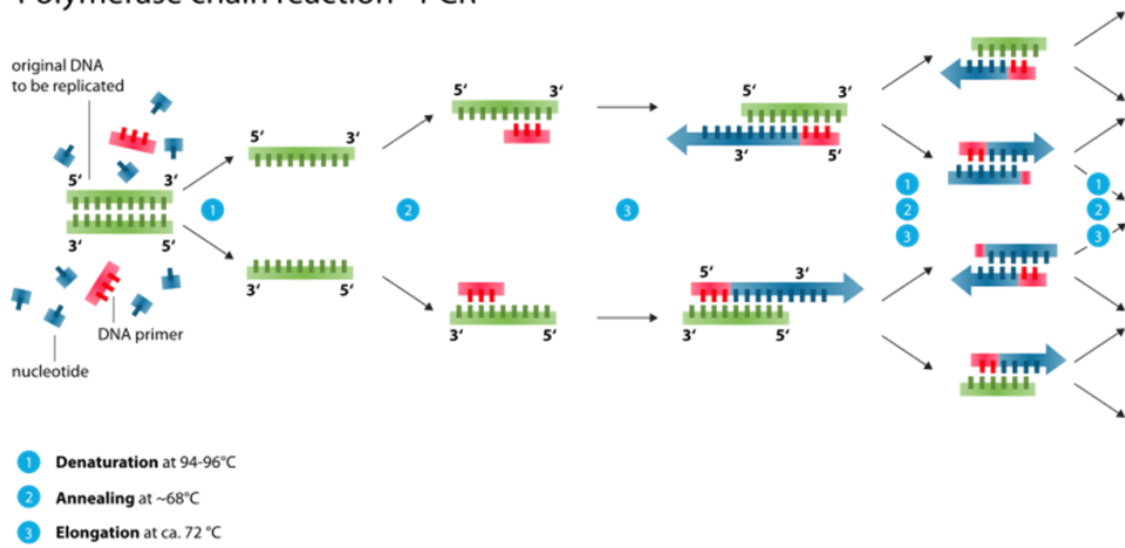


Figura 30: PCR – annealing și extensia [<https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>]

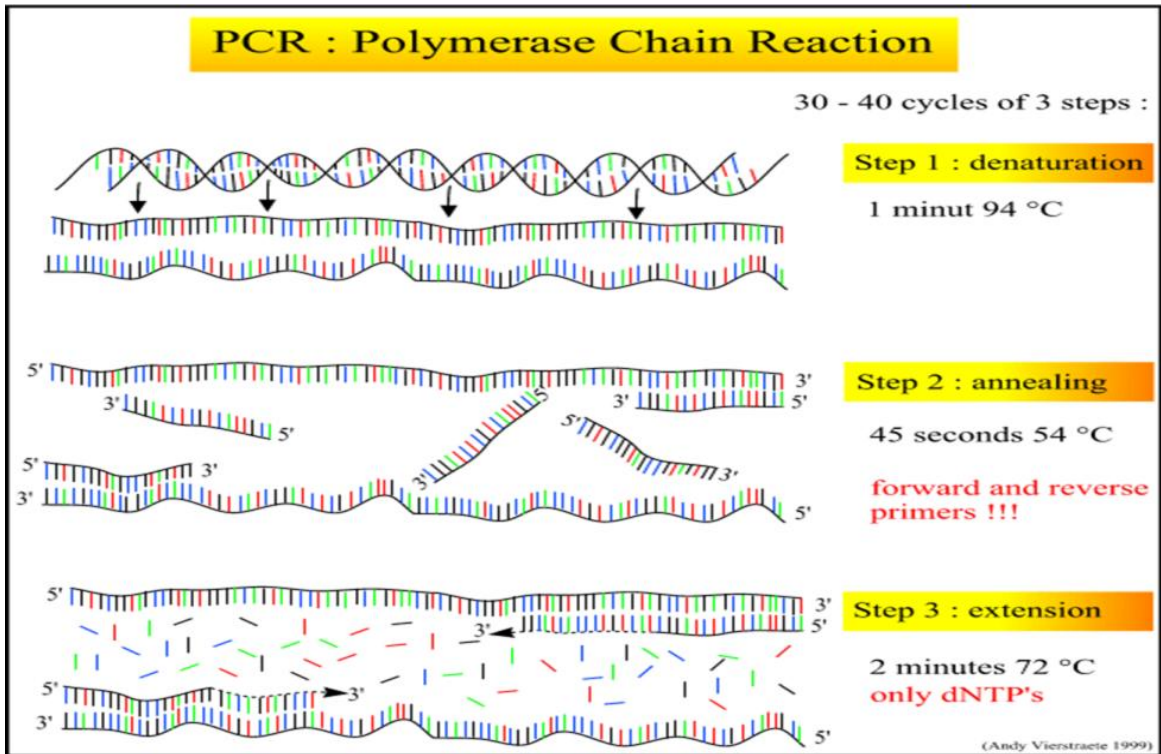


Figura 31: PCR: amplificarea exponențială [<https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>]; [<https://www.quora.com/Why-does-the-target-PCR-product-first-appear-in-the-third-cycle>]

Detecția și identificarea produsului amplificat se poate face prin:

a. PCR convențional de tip “end-point”: identificarea produsului amplificat prin electroforeza în gel cu vizualizarea migrării probei sub lumina UV; interpretarea rezultatelor se face prin compararea cu profilul electroforetic al unui control pozitiv.

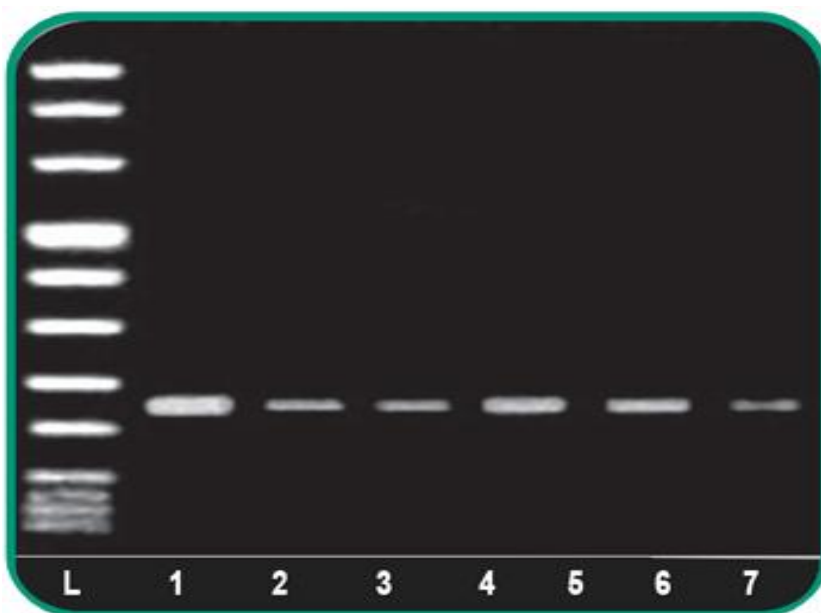


Figura 32: PCR tip “end-point” [<http://www.accuris-usa.com/Products/accuris-taq-plus/>]

b. Real time PCR: detecția amplificării se face în timp real și se bazează pe măsurarea fluorescenței care crește exponențial și proporțional cu numărul de copii de acid nucleic generate la fiecare ciclu de reacție; interpretarea se face vizualizând și analizând curbele de amplificare ale probelor în comparație cu cele ale unor controale negative și pozitive.

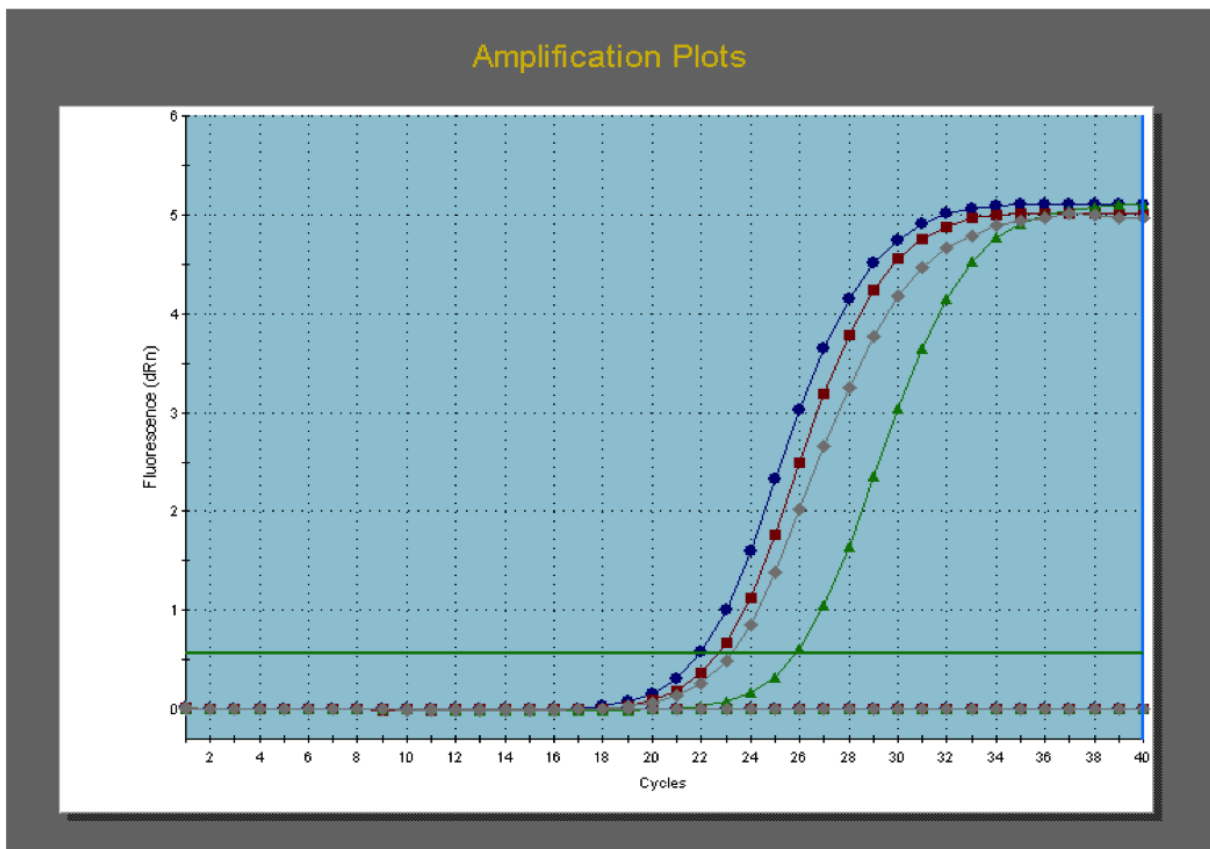


Figura 33: Real-time PCR: curbele redau amplificarea exponențială în timp real a materialului genetic inițial (amplificarea acizilor nucleici extrași din probele de testat); rezultatul pozitiv/negativ se interpretează în funcție de numărul ciclului în care curba de amplificare intersectează o valoare-prag a fluorescenței (Ct = cycle threshold)

[<http://biowithdylanatclark.blogspot.com/2012/01/designing-better-rt-pcr-primers.html>]

Aplicații. PCR este folosit din ce în ce mai mult în domeniul științelor biologice și medicale. Reprezintă o metodă de diagnostic precisă și extrem de sensibilă care poate evidenția cantități foarte mici de ADN infecțios bacterian, viral sau parazitar (*Helicobacter pylori*, *E. coli* enterotoxigen, chlamydii, leptospire, HIV, virusul hepatitei B, citomegalovirus, papilomavirusuri umane, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocistis carinii* etc.). În biologia moleculară este o tehnică de elecție, printre altele reprezentând o etapă intermediară pentru determinarea secvenței nucleotidice a ADN-ului diverselor specii.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Angelescu M.** Terapia cu antibiotice. Editura Medicală, București, 1998
2. **Bîlbîie V, Pozsgi N.** Bacteriologie Medicală – volumul I. Editura Medicală, București, 1984
3. **Bîlbîie V, Pozsgi N.** Bacteriologie Medicală – volumul II. Editura Medicală, București, 1985
4. **Buiuc D, Neguț M.** Tratat de Microbiologie Clinică. Editura Medicală, București, 1999
5. **Buiuc D.** Microbiologie clinică - volumul I. Editura Didactică și Pedagogică, R.A. București, 1998
6. **Buiuc D.** Microbiologie medicală-Ghid pentru studiul și practica medicinei. Ediția a VI-a. Editura Gr. T. Popa, Iași, 2003
7. **Bush K.** New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1085-1089
8. **Codiță I, Mazilu M, Mihai D, și colab.** Ghid Național pentru Aplicarea Procedurii de Testare a Sensibilității la Antibiotice conform Standardului CLSI/NCCLS. Publicație a Laboratorului Național de Referință pentru Infecții Nosocomiale și Rezistență la Antibiotice din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino", în colaborare cu specialiști din alte Laboratoare de Referință în cadrul "Grupului de studiu al rezistenței la antibiotice". Versiunea 0- Pentru Consens Național
9. **Debeleac L, Popescu-Drânda MC.** Microbiologie. Ed Medicală AMALTEA, București, 2003
10. **Dinu V, Truția E, Popa-Cristea E, Popescu A.** Biochimie medicală. Ed Medicală, București, 1996
11. **Elliot T, Hastings M, Desselberger U.** Medical Microbiology. Third Edition. Blackwell Science Ltd. 1997
12. **Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF.** Medical Microbiology. Fifteenth Edition. Churchill Livingstone, 1998
13. **Greenwood D.** Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press, 1989
14. **Jarlier V.** Enterobacteries et β lactamines, L'antibiogramme. MPC Vigot 1985, 87-101

15. **Jehl F, Chomarat M, și colab.** De la antibiogramă la prescripție. Ediția aII-a. Editura Științelor Medicale, București, 2003
16. **Licker M, Moldovan R, Crăciunescu M, Dumitrașcu V.** Rezistența la antibiotice - istorie și actualitate. Editura Eurostampa, Timișoara, 2002
17. **Lorian V.** Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams &Wilkins, 2005
18. **Mahon C, Manuselis G.** Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. W.B. Saunders Company, USA, 2000
19. **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000
20. **McPherson RA, Pincus MR.** Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-first Edition. Saunders Elsevier, USA, 2007
21. **Mims C, Dockrell HM, Goering RV, et al.** Medical Microbiology. Third Edition. Elsevier Limited. Spain. 2004
22. **Mims CA, Dockrell HM, Goering RV, et al.** Medical Microbiology. Third Edition. Mosby-Year Book Europe Limited, 2006
23. **Moldovan R, Licker M, Doroiu M, și colab.** Microbiologie-Îndreptar de lucrări practice. Lito U.M.F. Timișoara, 2002
24. **Pappas PG.** Laboratory in the diagnosis and management of urinary tract infections. Med Clin North Am. 1991; 75: 313-25
25. **Pilly E.** Maladies Infectieuses, APPIT, 12Edition, Montmorency, 1992
26. **Poiată A.** Microbiologie farmaceutică. Ed. Tehnică, Științifică și Didactică CERMI, Iași, 2004
27. **Schäffler A, Altekrüger J.** Microbiologie Medicală și Imunologie. Editura ALL, București, 1994
28. **Vandepitte J, Engbaeck K, Piot P, Heuck CC.** Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire. O.M.S., Genève, 1994
29. **Winn WC Jr, Koneman EW, Allen SD, et al.** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Lippincott Williams &Wilkins. USA. 2006
30. **Zarnea G.** Tratat de Microbiologie Generală – volumul III. Editura Academiei R.S.R., 1986