



**UMFT**

Universitatea de  
Medicină și Farmacie  
„Victor Babeș”  
din Timișoara

# **MICROBIOLOGIE SPECIALĂ**

## **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**

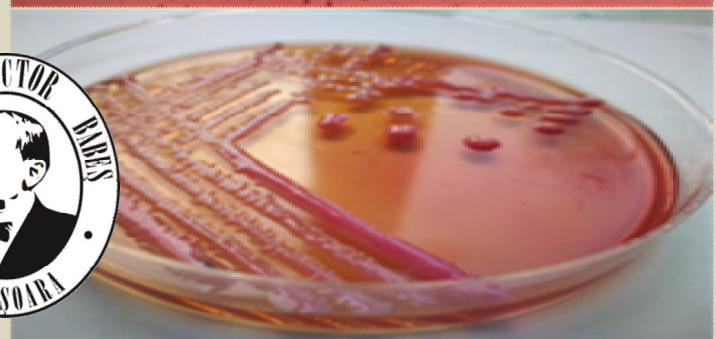
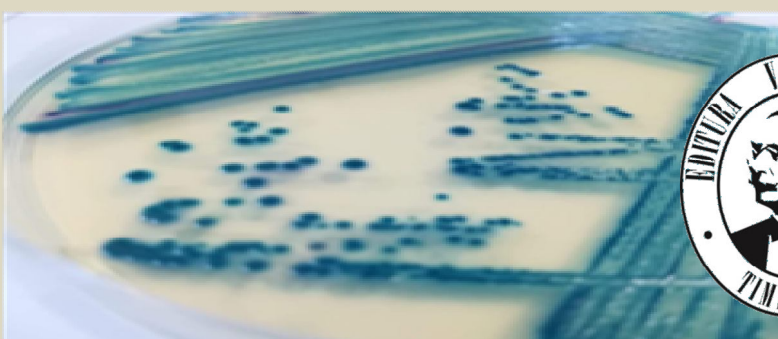
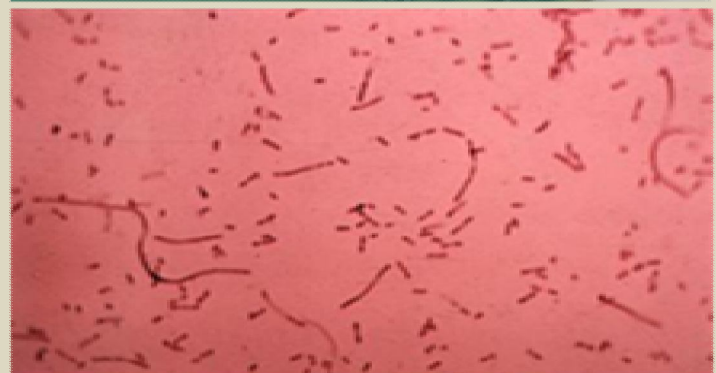
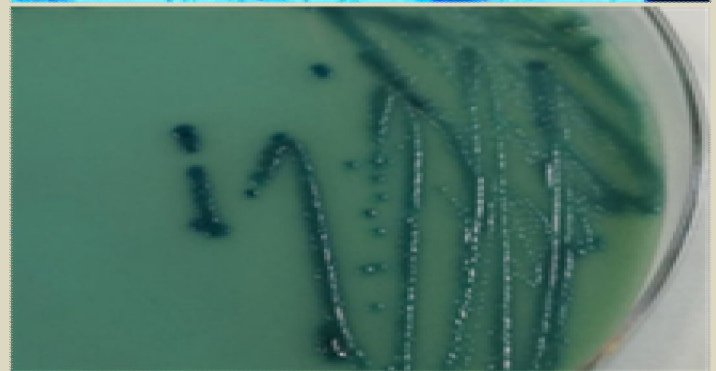
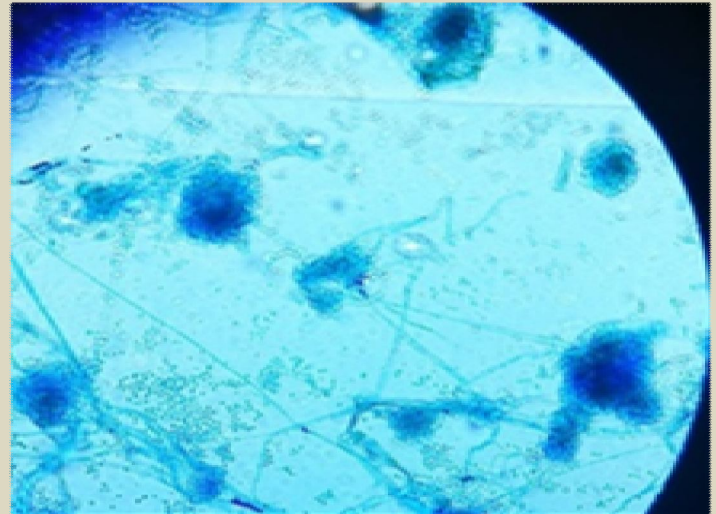
**As. univ. dr. MATILDA RĂDULESCU**

**As. univ. dr. CIPRIAN PILUȚ**

**As. univ. dr. IULIA BAGIU**

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

**Medic primar dr. DANA BREHAR CIOFLEC**



**Editura „Victor Babeș”**

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

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

**www.umft.ro/editura**

**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 CNCSIS: 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 978-606-786-115-0**

## CUPRINS

<b>1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STAFILOCOCICE.....</b>	<b>5</b>
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.2. Stafilococii coagulazo-negativi .....	11
<b>2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE STREPTOCOCI.....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Streptococcus pyogenes</i> (streptococul de grup A).....	13
2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i> (streptococul de grup B) .....	18
2.3. Streptococii viridans.....	19
2.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	19
2.5. Genul <i>Enterococcus</i> .....	22
<b>3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GENUL <i>NEISSERIA</i> .....</b>	<b>25</b>
3.1. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	25
3.2. <i>Neisseria meningitidis</i> .....	28
<b>4. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE BACILI GRAM POZITIVI AEROBI .....</b>	<b>30</b>
4.1. Genul <i>Corynebacterium</i> .....	30
4.2. Genul <i>Listeria</i> .....	33
4.3. Genul <i>Bacillus</i> .....	35
<b>5. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN FAMILIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>.....</b>	<b>39</b>
5.1. Genul <i>Salmonella</i> .....	41
5.2. Genul <i>Shigella</i> .....	46
5.3. Genul <i>Escherichia</i> .....	47
5.4 Genul <i>Klebsiella</i> .....	52
5.5 Genul <i>Proteus</i> .....	54
5.6 Genurile <i>Morganella</i> și <i>Providencia</i> .....	56
<b>6. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU BACILI GRAM NEGATIVI NON-FERMENTATIVI .....</b>	<b>57</b>
6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
6.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	59
<b>7. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU ALTE TIPURI DE BACILI GRAM NEGATIVI AEROBI.....</b>	<b>62</b>
7.1. Genul <i>Campylobacter</i> .....	62
7.2. <i>Helicobacter pylori</i> .....	64
7.3. Genul <i>Haemophilus</i> .....	66
<b>8. DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC IN INFECȚIILE PRODUSE DE GERMENI ANAEROBI.....</b>	<b>69</b>
8.1. Norme generale de conduită în diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni anaerobi .....	69
8.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de genul <i>Clostridium</i> .....	71
8.2.1. Clostridiile gangrenei gazoase.....	71

8.2.2. <i>Clostridium botulinum</i> .....	72
8.2.3. <i>Clostridium difficile</i> .....	72
8.3. Germeni anaerobi endogeni, nesporulați .....	74
8.3.1. Bacili gram negativi anaerobi .....	74
8.3.2. Bacili gram pozitivi anaerobi .....	74
8.3.3. Cocii gram pozitivi anaerobi .....	74
8.3.4. Cocii gram negativi anaerobi.....	74
<b>9. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMI DIN GENUL MYCOBACTERIUM.....</b>	<b>75</b>
9.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	75
<b>10. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE BACTERII SPIRALATE ....</b>	<b>80</b>
10.1. <i>Treponema pallidum</i> .....	80
10.2. <i>Borrelia</i> .....	85
<b>11. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE MICOPLASME.....</b>	<b>89</b>
<b>12. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU CHLAMYDIA TRACHOMATIS .....</b>	<b>91</b>
<b>13. ROLUL LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL INFECȚIEI ASOCIATE ASISTENȚEI MEDICALE .....</b>	<b>94</b>
<b>14. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE FUNGI .....</b>	<b>98</b>
14.1. Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri.....	98
14.1.1. Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri din genul <i>Candida</i> .....	98
14.2. Diagnosticul de laborator al afecțiunilor produse de mucegaiuri .....	102
14.2.1. Genul <i>Aspergillus</i> .....	102
<b>15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR VIRALE.....</b>	<b>104</b>
15.1. Citologia.....	104
15.2. Microscopia electronică.....	104
15.3. Cultivarea .....	105
15.4. Serologia.....	105
15.5. Metode moleculare.....	107
15.6. Diagnosticul de laborator al gripei.....	108
15.7. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale.....	110
15.8. Diagnosticul de laborator în infecția HIV .....	113
<b>Bibliografie selectivă.....</b>	<b>116</b>

## 1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR STAFILOCOCICE

Familia Micrococcaceae cuprinde genurile *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* și *Planococcus*.

Genul *Staphylococcus* conține 42 de specii și 24 subspecii microbiene, dintre care de interes medical sunt *S. aureus* (specie condiționat patogenă), *S. epidermidis*, *S. schleiferi*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, etc. (specii accidental patogene, cu potențial patogen redus la gazda imunocompetentă).

Stafilococii sunt coci gram pozitivi, aerobi și facultativ anaerobi, nesporulați, catalazo-pozitivi, rotunzi, dispuși în grămezi, sub formă de ciorchine de strugure.

### 1.1. *Staphylococcus aureus*

**Semnificația clinică.** *S. aureus* este cauza unor infecții de gravitate variabilă, cu diverse localizări, în funcție de poarta de intrare:

- cutanate și subcutanate: foliculite, furuncule, impetigo, orjelet, hidrosadenite, panariții, mastite, carbuncule;
- ale mucoaselor: otite, sinuzite, pneumonii etc.;
- ale țesutului osos și articular: osteomielite, artrite septice;
- ale aparatului urinar: cistite, prostatite, pielonefrite, abcese renale;
- ale aparatului cardio-vascular: endocardite, flebite, septicemii;
- ale aparatului digestiv: toxiinfecții alimentare;
- ale aparatului genital: metrite, anexite;
- ale SNC: meningite, abces cerebral;
- infecții nosocomiale.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de *S. aureus* este bacteriologic, cel serologic neavând valoare practică.

**Recoltarea.** Produsele patologice sunt variate, în funcție de localizarea infecției:

- în *infecțiile cutanate* și osteomielită produsul patologic este puroiul, a cărui recoltare se efectuează în raport cu colecția purulentă. Dintr-o colecție închisă, prelevarea puroiului se face de către chirurg, după deschiderea colecției. Din colecțiile deschise sau fistulizate recoltarea se face cu un tampon steril;
- în *infecțiile purulente ale seroaselor*, produsele biologice (lichidul pleural, articular, cefalo-rahidian) sunt prelevate prin punționarea cavităților respective cu o seringă sterilă și introduse apoi în eprubete sterile;
- în *infecțiile urinare* se practică urocultura;
- în *septicemii* se recoltează sângele;
- în *toxiinfecții alimentare* se recoltează materiile fecale, vărsături, resturi alimentare;
- în *angine* și la *purtătorii sănătoși* se recoltează exudatul nazal și faringian.

Recoltarea produselor patologice se face înainte începerii oricărui tratament cu antibiotice.

**Examenul direct.** Examenul macroscopic evidențiază un puroi galben cremos iar examenul microscopic pe frotiuri colorate Gram, efectuate din puroi, relevă în primul rând prezența leucocitelor, din care majoritatea sunt distruse și coci sferici cu diametrul de 0,5-1 μm, Gram pozitivi, dispuși în grămezi (ciorchine), în perechi sau izolat, intra și extracelular.

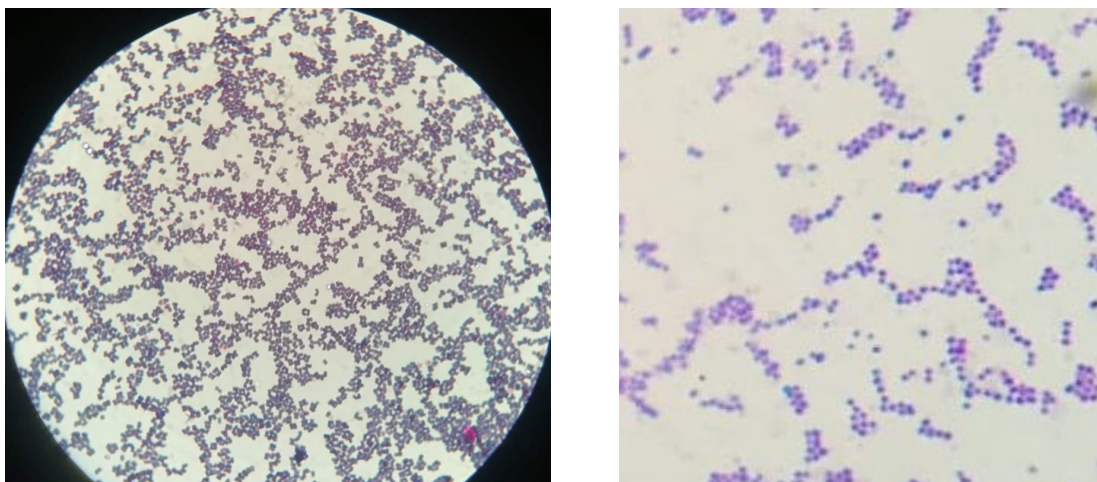


Figura 1: *Staphylococcus* sp.: Examen microscopic din cultură-colorație Gram

Produsele provenite din colecții închise sau cele care nu sunt puternic contaminate (exudatul faringian, de pildă) sunt însămânțate direct pe geloză cu sânge de berbec 5%.

Produsele puternic contaminate (materii fecale) se cultivă inițial pe mediul de îmbogățire hiperclorurat Chapman lichid. După o incubare de 12-18 ore la 37°C se face trecerea pe mediul de izolare Chapman solid, mediu care prin conținutul său în manitol și indicator de pH diferențiază coloniile manito-pozitive (de culoare galbenă) de cele manito-negative (de culoare roz);

**Identificarea** microorganismelor existente în sânge se face prin hemocultură, care se efectuează după tehnica prezentată la partea generală. Sângele este însămânțat direct în cele 2 flacoanele de hemocultură (aerob /anaerob), incubat la 37°C, timp de 48 h – 2 săptămâni, până la pozitivare/negativare (semnalizată prin semnal sonor de către incubatorul automat de hemoculturi).

Mediile cromogene sunt folosite în principal pentru diagnosticul bacteriologic de rutină, având ca scop reducerea timpului și a consumabilelor utilizate prin metodologia clasică. Mediile cromogene sunt folosite cel mai frecvent fie pentru diagnosticul *S. aureus* subsp. *aureus*, fie pentru diferențierea tulpinilor metilino rezistente de *S. aureus* subsp. *aureus* (MRSA).

Identificarea se face pe baza caracterelor morfotinctoriale, culturale și a unor teste de patogenitate. În scop epidemiologic, diagnosticul se completează cu lizotipia.

*Caractere morfotinctoriale:* pe frotiurile din culturi se văd coci gram pozitivi cu așezare caracteristică, în grămezi.

*Caractere culturale:* pe geloză-sânge *S. aureus* produce colonii caracteristice ușor de recunoscut. Ele sunt colonii de tip S, mari, cu diametru de 1-3 mm, rotunde, bombate, netede, cu margini regulate, hemolitice și pigmentate. Coloniile tinere sunt incolore. Pigmentarea coloniilor mature se face în prezența oxigenului și la temperatura camerei. Cel mai frecvent pigment este cel auriu (80%), urmat de pigmentul alb și foarte rar cel citrin.



Figura 2: Cultură de *S.aureus* pe mediul solid geloză-sânge

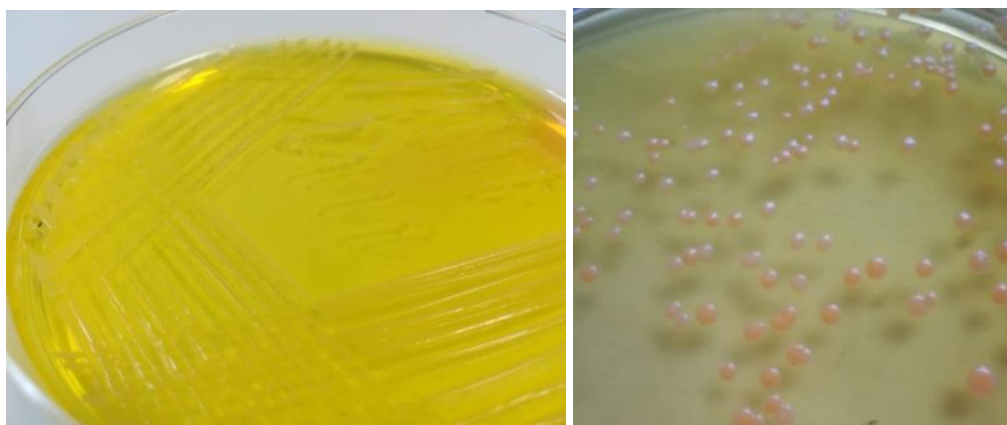


Figura 3: Cultură de *S. aureus* pe mediul solid Chapman (colonii manito-pozitive)

Pentru stabilirea apartenenței la specia *S. aureus* se fac teste de patogenitate, din care evidențierea coagulazei este obligatorie.

Teste de patogenitate in vitro:

- **hemolizinele** se evidențiază pe geloză-sânge. Stafilococul elaborează 5 tipuri de hemolizine, dintre care mai importante sunt hemolizina  $\alpha$ , ce produce o zonă de liză clară în jurul coloniilor, și hemolizina  $\beta$ , care determină o zonă de liză incompletă, turbure, net delimitată ce se clarifică după 12 ore la  $+4^{\circ}\text{C}$ ;
- **coagulaza:** *S. aureus* secretă două coagulaze, una legată, numită și “clumping factor” și coagulaza liberă. Ele se evidențiază prin:  
tehnica pe lamă pentru coagulaza legată - “clumping factor”, printr-o reacție de aglutinare cu utilizare de plasmă  
tehnica în tuburi (pentru coagulaza liberă), care constă în coagularea plasmei (se utilizează sânge de iepure recoltat pe soluție de oxalat de potasiu);  
Coagulaza pe lamă prin utilizarea de kituri/truse comerciale (trusa Bio Rad: PASTOREX-STAPH-PLUS, trusa bio Mérieux : Slidex Staph etc.);

*Principiu:* Reacția este o latex-aglutinate pe lamă care evidențiază simultan prezența “clumping factorului” (factorul de afinitate pentru fibrinogen), proteinei A (care prezintă o afinitate crescută pentru fragmentul Fc al IgG) precum și antigenul polizaharidic capsular, specific speciei *S. aureus*. Particulele latex sunt sensibilizate cu fibrinogen, IgG și anticorpi anticapsulari monoclonali specifici. Cultura de *S. aureus* se omogenizează pe lamă cu reactiv latex. Apariția aglutininelor pe lamă la scurt timp după efectuarea reacției indică prezența *S. aureus*. Stafilococii coagulazo-negativi (SCN) prezintă reacții negative în proporție de 99,1%.

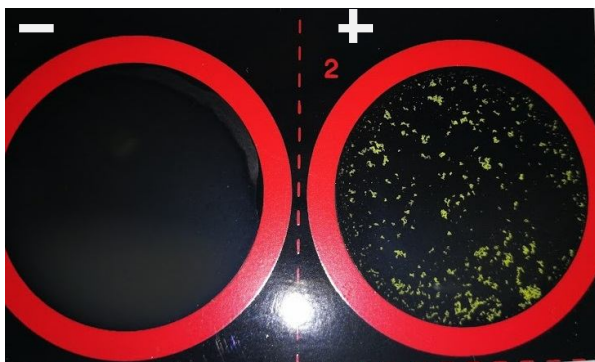


Figura 4: Testul coagulazei

- **catalaza:** câteva colonii de stafilococ de pe un mediu de cultură fără sânge se emulsionează într-o picătură de  $H_2O_2$  pe o lamă de microscop sau în 1 ml.  $H_2O_2$  într-un tub de reacție. Eliberarea bulelor de gaz indică prezența catalazei.
- **fermentarea manitolului:** pe mediul Chapman solid, stafilococii manito-pozitivi produc virarea culorii mediului din roz în galben datorită indicatorului de pH.

În prezent multe companii au introdus pe piață diverse **truse manuale, sisteme automatizate sau teste de biologie moleculară**, care identifică speciile de stafilococi cu o precizie mare.

- a. **API Staph** (bio Mériex) este un sistem standardizat pentru identificarea genurilor *Staphylococcus*, *Micrococcus* și *Kocuria*, care utilizează 21 teste biochimice miniaturizate. Citirea acestor reacții se face cu ajutorul tabelului de citire, iar identificarea este obținută cu ajutorul programului soft dedicat identificării cu truse API (API web).
- b. **Sistemul Vitek 2** compact (bio Mériex) reprezintă un sistem automat cu ajutorul căruia se identifică și se testează sensibilitatea la chimioterapicele antiinfecțioase a stafilococilor, utilizând carduri de tip VITEK® 2 GP (pentru identificare) și respectiv VITEK®2 AST GP (pentru testele de sensibilitate) într-un interval de 18-24 de ore. Un alt sistem automat de identificare ar fi Microscan.
- c. O metodă nouă și foarte exactă este spectrometria de masă, de tip **MALDI-TOF**, care constă în analiza proteomică prin spectrometrie de masă a proteinelor specifice extrase din ribozomi.
- d. Teste de biologie moleculară: există numeroase studii care descriu folosirea **reacției de polimerizare în lanț (PCR)** pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor de *S. aureus*. Dată fiind importanța detectării rezistenței la meticilină (oxacilină), anumite metode utilizate se concentrează direct pe amplificarea genei *mecA*, fie singură, fie în PCR multiplex, cu amplificarea simultană a unor markeri adiționali.
- e. **PCR Xpert MRSA/SA** nasal assay (Cepheid) este primul test comercial care detectează simultan gena *mecA* și locul de inserție *attB*. Acest test este utilizat în spitale pentru screeningul persoanelor colonizate nazal cu MRSA. Rezultatul se obține în aproximativ o oră de la recoltarea exudatului nazal.



**Sensibilitatea la antibiotice.** Începând deja cu anii 1950-60 a fost semnalată o creștere rapidă a rezistenței tulpinilor *S. aureus* la antibiotice, efectuarea antibiografei devenind obligatorie pentru toate tulpinile de *S.aureus* izolate din diverse infecții.

Antibioticele utilizate pentru testarea sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase la tulpinile de *S.aureus* sunt:

- $\beta$ -lactamine: penicilina pentru identificarea tulpinilor producătoare de beta-lactamază și cefoxitinul (folosit ca marker surogat) pentru identificarea tulpinilor de *Stapylococcus spp.* meticilino-rezistente (MRSA, MRSE etc.)
- glicopeptide: vancomicina, teicoplanina (utilizate ca antibiotice de rezerva în cazul tulpinilor MRSA)
- macrolide, lincosamide, streptogramine (pentru identificarea tulpinilor cu fenotip MLSB): eritromicina, clindamicina
- aminoglicozide: gentamicina
- trimetoprim/sulfametoxazol
- fluoroquinolone: ciprofloxacina, moxifloxacina
- linezolid (utilizat ca antibiotic de rezervă în cazul tulpinilor MRSA)
- rifampicina,
- tetracicline (opțional)

Testarea se face prin metoda difuzimetrică. Se prepară un inocul de 0,5 McFarland, se însămânțează pe mediul Muller Hinton, se incubează în aerobioză la 35°C, timp de 18 +/- 2 h (pentru glicopeptide interpretarea se face doar pe baza de CMI).

Peste 95% din tulpinile de *S.aureus* sunt producătoare de beta-lactamază (rezistente la penicilina). Aceste tulpini pot fi considerate rezistente nu doar la penicilină, ci și la ampicilină, amoxicilină, piperacilină, ticarcilină, dar combinațiile ce conțin inhibitorii de beta-lactamază (amoxicilină+acid clavulanic, ticarcilină +acid clavulanic etc.) sunt active.

Pentru identificarea tulpinilor MRSA se folosește discul de cefoxitină de 30 ug.

Interpretare:

-diametru  $\geq 22$  mm: tulpini de *S. aureus* meticilino-sensibile (MSSA)

-diametru < 22 mm: tulpini de *S. aureus* meticilino-rezistente (MRSA)

NU se raportează rezultatul cefoxitinului – în funcție de acesta pe antibiogramă se comunică sensibilitatea/rezistența la oxacilină și se adaugă comentariu despre celelalte beta-lactamine.

Tabel 1: Interpretarea fenotipurilor de rezistență la beta-lactamine a tulpinilor de *S.aureus* (CLSI 2018)

Cefoxitin	Penicilină	Interpretare
S	S	MSSA sensibil la toate $\beta$ -lactaminele (excepție: ceftazidim, cefixim, ceftibuten)
S	R	MSSA producător de beta-lactamază* (sensibil la beta-lactamine cu excepția penicilinei, ampicilinei, amoxicilinei și a cefalosporinelor ceftazidim, cefixim, ceftibuten)
R	R	MRSA rezistent la toate $\beta$ -lactaminele*

Legendă: \*unele tulpini MRSA pot fi sensibile la ceftobiprole și ceftaroline (de testat); MRSA=*S.aureus* meticilino-rezistent, MSSA= *S.aureus* meticilino-sensibil

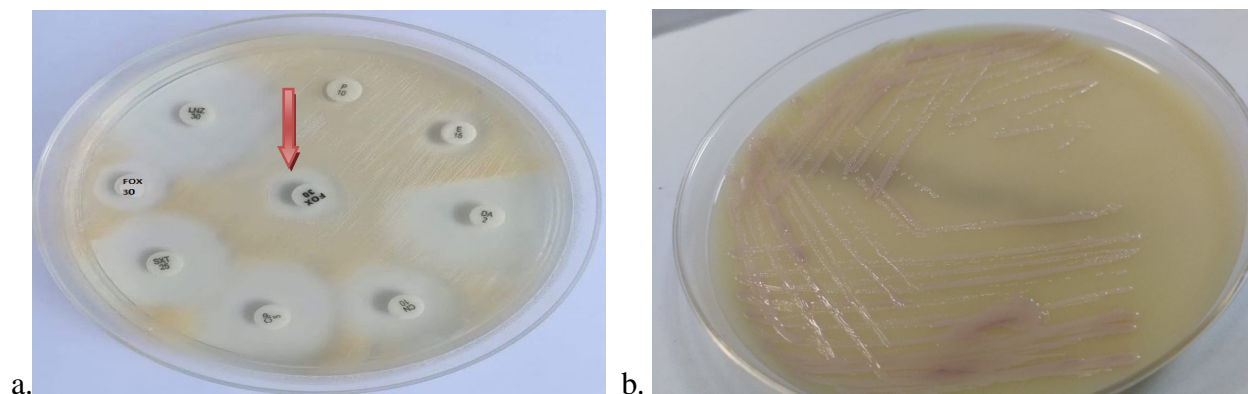


Figura 5: (a) Fenotip MRSA pe antibiogramă difuzimetrică-mediul Mueller-Hinton, (b) test screening pozitiv pe mediul solid cromogen-Brilliance MRSA (colonii de culoare roz)

Pentru screeningul pacienților colonizați cu tulpini MRSA se pot folosi medii selective cromogene de tip mediului solid cromogen-Brilliance MRSA.

Pentru interpretarea fenotipurilor de rezistență la MLSB (macrolide, lincosamide, streptogramina B) se efectuează Testul D: plasarea discurilor de clindamicină și eritromicină la distanță de maxim 2 cm pe suprafața însămânțată a mediului Muller Hinton.

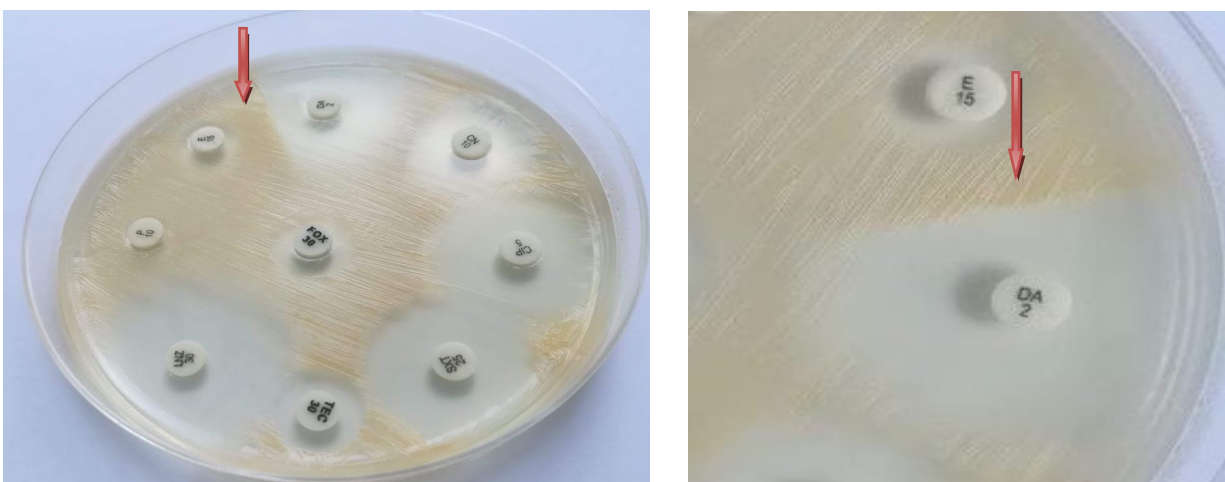


Figura 6: Testul D- Fenotip MLSB inductibil, metoda difuzimetrică-mediul Mueller-Hinton

**Diagnosticul toxiinfecțiilor alimentare.** Toxiinfecțiile alimentare date de stafilococ se produc prin ingerarea unui aliment contaminat cu *S. aureus* enterotoxic. Diagnosticul se bazează pe izolarea din alimente și din produsele patologice (vărsături, fecale) și evidențierea enterotoxinei care are 6 tipuri antigenice A, B, C, C<sub>1</sub>, D, E.

Însămânțarea produselor patologice se face pe mediul Chapman solid, iar coloniile manito-pozitive se repică pe geloză. Izolarea stafilococilor din produsele menționate nu are valoare decât dacă se evidențiază enterotoxina care se tipizează. Mai frecvent întâlnite sunt serotipurile A și D. Enterotoxinele se evidențiau în trecut *in vivo* printr-o boală experimentală la pisici tinere, numită testul Dolman (injecție intraperitoneală de filtrat de cultură de stafilococică, urmată de diaree și vărsături, dacă în filtrat era prezentă enterotoxina).

*In vitro*, enterotoxina se evidențiază pe baza proprietății ei de a precipita plasma oxalată. În prezent determinarea enterotoxinelor stafilococice se face prin *metoda latex-aglutinării* (aglutinare pasivă inversă). Pentru efectuarea testului se utilizează seruri cu anticorpi antitoxici A, B, C, C<sub>1</sub>, D și E adsorbiți pe particule de latex ce se pun în contact cu antigenul solubil (enterotoxina) extras dintr-un filtrat de cultură lichidă. Reacția pozitivă se manifestă prin apariția aglutinării.

## 1.2. Stafilococii coagulazo-negativi

**Semnificația clinică.** *S. epidermidis*, comensal obișnuit al tegumentelor umane, devine accidental patogen, fiind implicat în etiologia endocarditelor subacute la pacienții cu proteze valvulare cardiace sau în urma altor intervenții pe cord, când bacteria poate fi antrenată de pe tegumente în țesuturile profunde. De asemenea, în urma unor puncții lombare poate produce meningite. Este germenele care compromite cel mai frecvent protezele de șold.

*S. schleiferi* și *S. lugdunensis* colonizează materialele de implant, catetere, tuburi de dren. Ambele specii se găsesc rar și în cantitate mică pe tegumentele sănătoase.

*S. lugdunensis* este responsabil de producerea unor infecții severe: endocardite pe valvele naturale și pe protezele valvulare, septicemii, abcese cerebrale, infecții profunde ale țesuturilor, osteite, osteo-artrite cronice, infecții vasculare protetice, infecții ale plăgilor și tegumentelor. *S. schleiferi* apare mai puțin frecvent în mediul spitalicesc și are un rol mai scăzut în infecțiile umane. Germenele a fost izolat în cazuri de empiem cerebral, infecții ale plăgilor și osteite cu bacteriemie.

*S. haemolyticus*, al doilea ca frecvență dintre speciile coagulazo-negative, poate fi implicat în endocardite valvulare, septicemii, peritonite, infecții ale tractului urinar și ale plăgilor.

*S. saprophyticus* determină infecții ale tractului urinar la femei tinere active sexual.

Stafilococii coagulazo-negativi (SCN) sunt luați în considerare numai în cazul în care sunt izolați ca floră predominantă sau în cultură pură din urină, LCR, lichid sinovial, hemoculturi (adică din produse în mod natural sterile).

Ei se deosebesc de *S. aureus* prin lipsa clumping factorului, a coagulazei libere precum și prin rezistența la novobiocină (în cazul *S. saprophyticus*). Identificarea tulpinilor care se abat de la aceste reguli se face pe baza unor teste biochimice suplimentare.

## 2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE STREPTOCOCI

Streptococii aparțin unui ansamblu heterogen de coci gram pozitivi, sferici sau ovoidali, dispuși în perechi sau lanțuri, nesporulați, imobili, facultativ anaerobi, lipsiți de citocromi și catalază, având necesități nutriționale complexe.

Din punct de vedere taxonomic streptococii aparțin familiei *Streptococaceae*, care înglobează 7 genuri (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* și *Lactococcus*), împărțite, la rândul lor, în peste 80 de specii și subspecii. Datorită mării diversități a acestor germeni, nu este suficient un singur criteriu de clasificare care să-i poată diferenția. Astfel, pe baza tipului de hemoliză produsă pe mediile cu sânge, streptococii se clasifică în:

- *streptococi beta hemolitici*, care produc hemoliză completă, clară, denumită hemoliză de tip beta, caracteristică speciilor patogene;
- *streptococi alfa' hemolitici* care produc hemoliză incompletă, cu aspect voalat, încețoșat;
- *streptococi alfa hemolitici* care produc hemoliză parțială cu apariția unei colorații verzui a mediului (hemoliză viridans), caracteristică streptococilor viridans și pneumococilor;
- streptococi nehemolitici.

Criteriul de clasificare bazat pe *structura antigenică* (introdus de Lancefield) este cel mai important din punct de vedere clinic și epidemiologic. După natura *antigenului polizaharidic C* din peretele celular (antigen specific de grup), streptococii se împart în grupe serologice, desemnate cu literele mari ale alfabetului latin. Până în prezent s-au identificat serogrupurile notate de la A la H și de la K la V.

Fiecare grup poate fi divizat în serotipuri (notate cu cifre arabe), pe baza antigenelor proteice de perete. **Grupul A**, cel mai important din punct de vedere al patogenității, se împarte în funcție de proteinele M și T (antigene specifice de tip) în peste 80 de tipuri. Urmează, în ordinea frecvenței, grupurile **C, G, B, D, F**.

Streptococii **lipsiți de antigen de grup** (cea mai mare parte din streptococii viridans, *S. pneumoniae* etc.) nu sunt incluși în grupele Lancefield.

În practica curentă a laboratoarelor de bacteriologie, clasificarea se bazează pe o combinație de caracteristici care includ tipul de hemoliză pe geloză-sânge, structura antigenică, caracterele culturale și biochimice.

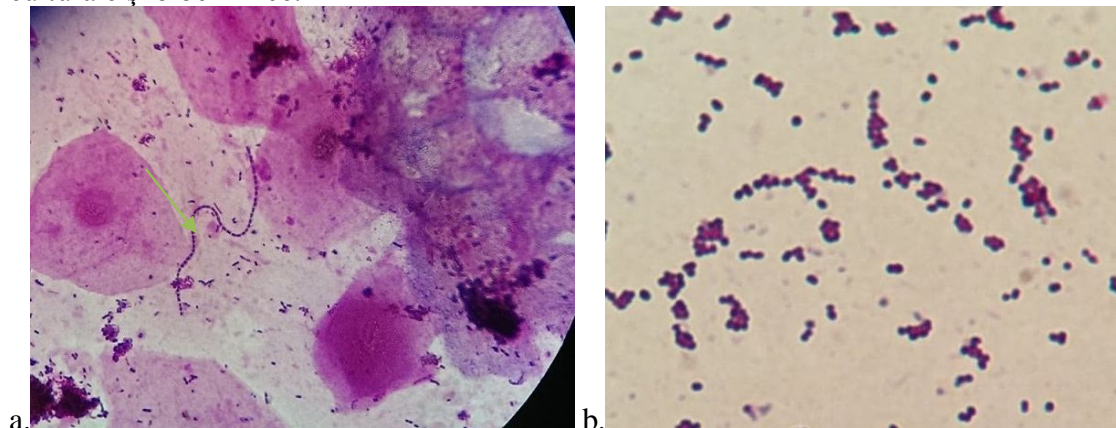


Figura 7: *Streptococcus* sp. : Examen microscopic (a) produs biologic, (b) cultură

## 2.1. *Streptococcus pyogenes* (streptococul de grup A)

**Semnificația clinică.** Streptococii piogeni produc infecții cu localizări variate și manifestări clinice diverse. Infecțiile acute, cu **localizare respiratorie** (faringita, scarlatina) pot evolua spre complicații grave, prin mecanism alergic, de tipul reumatismului articular acut, carditei reumatismale, iar infecțiile cu **localizare cutanată** (erizipel, impetigo, intertrigo, pemfigus), spre glomerulonefrită acută, eritem nodos. Au mai fost raportate infecții genitale post-abortum/ post-partum, infecții în sfera ORL, infecții urinare, meningite, septicemii etc. Multe infecții acute nediate diagnosticate la timp și incorect tratate pot evolua spre complicații poststreptococice supurative, care se manifestă precoce (celulite, flegmoane, abcese, septicemii etc.).

Diagnosticul de laborator presupune izolarea și identificarea germenilor prin **diagnostic bacteriologic** și evidențierea anticorpilor antistreptococici prin **diagnostic serologic**.

### **Diagnostic bacteriologic**

**Recoltarea.** *Exudatul faringian* se recoltează dimineața, înainte ca pacientul să mănânce. Se vor șterge amigdalele și peretele posterior al faringelui, evitându-se atingerea cu tamponul faringian a limbii, a luei și contaminarea lui cu salivă. La *purtătorii sănătoși* se recoltează exudatul nazo-faringian.

În *infecțiile plăgilor* (plăgi chirurgicale, arsuri etc.), precum și în *alte afecțiuni purulente* (otite externe, sinuzite) produsul patologic este puroiul, care se recoltează cu un tampon steril sau prin puncție.

În *afecțiunile superficiale ale pielii* (impetigo, ectima, pemfigusul nou-născuților) se îndepărtează crusta și se recoltează conținutul vezicular prin frecarea fermă a tamponului de leziune. Manevra este dureroasă, dar necesară pentru a asigura un număr cât mai mare de germeni în probă.

LCR, sângele, urina etc. se recoltează conform metodologiei uzuale (a se vedea recoltarea produselor biologice de la partea generală).

După recoltare, produsul patologic se va expedia la laborator. Transportul diferă în funcție de natura prelevatului. Tamponanele utilizate pentru recoltarea exudatelor (faringian, nazo-faringian, nazal și din leziunile cutanate) se vor transporta în maximum două ore. Dacă acest interval se va prelungi, tamponanele se introduc în eprubete ce conțin un mediu selectiv îmbogățit:

- mediu Pick (cu bulion glucozat și cristal violet);
- bulion Todd-Hewitt (cu bulion, glucoză, infuzie de cord de bou).

Aceste medii conțin substanțe care favorizează dezvoltarea streptococilor (bulionul, glucoza, hematiile) și substanțe care inhibă flora de asociație (cristalul violet inhibă creșterea stafilococilor, iar azidul de sodiu pe cea a bacililor gram negativi).

LCR, sângele, urina, sputa și alte produse lichide se vor transporta imediat sau în interval de maximum o oră de la recoltare.

### **Examenul direct.**

*Examenul macroscopic* se poate aplica unui număr restrâns de produse patologice, ca de pildă în afecțiunile purulente în care se va observa aspectul seros al puroiului și în meningite, când LCR este tulbure, opalescent.

*Examenul microscopic.* Examenul direct al exudatului faringian, nazal și din leziunile cutanate are valoare redusă, datorită existenței în aceste zone a streptococilor nepatogeni, care nu diferă morfologic de cei patogeni. Prin urmare examenul microscopic nu este uzual.

LCR și urina vor fi centrifugate și din sediment se vor efectua frotiuri colorate Gram care relevă leucocite, coci gram pozitivi, ovalari, dispuși izolat sau în lanțuri, uneori fagocitați.

**Izolarea germenilor.** Streptococii necesită, în general, medii de izolare cu sânge datorită faptului că le lipsește catalaza. Se utilizează medii îmbogățite cu glucoză (care le stimulează înmulțirea) și lichide organice (sânge de iepure, cal, oaie, ser, lichid de ascită), care asigură aportul de aminoacizi și vitamine. Astfel de medii sunt geloză-sânge, bulionul Todd-Hewitt, mediul SSP (mediu selectiv pentru streptococ și pneumococ care conține geloză, acid nalidixic, cristal violet, glucoză, sânge difibrinat de berbec) etc.

Mediul de izolare se alege în funcție de produsul însămânțat. Cel mai frecvent se utilizează geloză-sânge de oaie 5%. Exudatele faringiene recoltate se pot însămânța în prima zi în mediu Pick care favorizează înmulțirea streptococilor în dauna altor specii. A doua zi se fac treceri pe geloză-sânge. Incubarea se face în atmosferă de CO<sub>2</sub> 10%.

**Identificarea** se bazează pe caracterele culturale și structura antigenică.

**Caractere culturale.** Pe geloză-sânge de oaie streptococul de grup A dezvoltă colonii mici, pulverulente (diametrul în jur de 0,5 mm), transparente sau translucide, bombate cu zona largă de hemoliză clară de tip beta, ce depășește de 2-4 ori diametrul coloniei. Privite la lupă, aceste colonii pot prezenta 4 aspecte: colonii “mucoide” (rotunde, convexe, opace), “matt” (plate, confluențe, cu suprafața mamelonată), “glossy” (mici, rotunde, lucioase, cu centrul ridicat, de consistență apoasă) și colonii “R”, rugoase, (plate, cu margini neregulate).

Primele două tipuri sunt caracteristice streptococilor virulenți, iar ultimele aparțin streptococilor lipsiți de antigen M (nevirulenți). Aceste aspecte culturale variază însă considerabil, în funcție de mediul utilizat și atmosfera de incubare. Diferențierea bolnavilor de purtătorii sănătoși se poate face și prin aprecierea semicantitativă a creșterii culturale, un număr redus de colonii indicând, de obicei, starea de portaj.

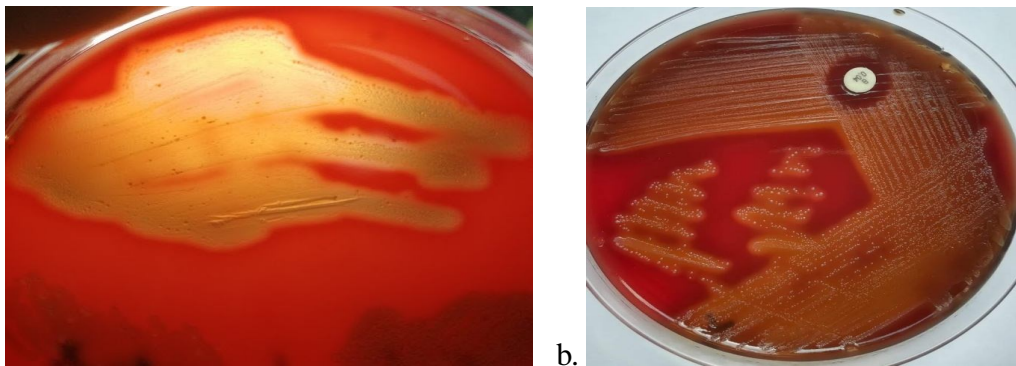


Figura 8: (a) Cultură pură de *S.pyogenes* pe geloză-sânge, hemoliză beta, (b) Testul sensibilității la bacitracină

Identificarea grupului.

**Testul sensibilității la bacitracină.** Este o metodă simplă, larg utilizată, care diferențiază streptococii de grup A, sensibili, de restul grupurilor (non grup A) rezistente la bacitracină. Se repică sub lupă câteva colonii de streptococi betahemolitici într-o eprubetă cu bulion glucozat 0,2%. După incubare la 37°C, timp de 18-24 ore se examinează cultura, care prezintă aspect caracteristic (mediu limpede, cu depozit pe fundul și pereții eprubetei). Se controlează puritatea culturii printr-un frotiu colorat Gram sau cu albastru de metilen, apoi se însămânțează foarte dens cu ansa pe o placă cu geloză-sânge. În mijlocul ariei însămânțate se depune un microcomprimat de bacitracină și se incubează placa la 37°C până a doua zi, când se citește și se interpretează. Dacă tulpina de cercetat aparține grupului A, creșterea ei va fi inhibată pe o arie cu diametrul de

minimum 10 mm în jurul microcomprimatului. Dacă creșterea se produce și în jurul microcomprimatului de bacitracină, germele cercetat aparține altui grup serologic.

**Metode bazate pe reacții Ag-Ac.** Determinarea grupului se face prin reacții de precipitare sau aglutinare. Aceste reacții antigen-anticorp impun contactul direct dintre Ag de grup (polizaharidul C) și Ac omolog (ser anti-grup A, anti-grup B etc.). Deoarece antigenul de grup se găsește în profunzimea peretelui celular al streptococilor, în stratul intermediar, el trebuie descoperit de sub stratul proteic care îl acoperă și nu permite contactul cu serul specific anti-grup. Extracția polizaharidului se poate realiza chimic (cu HCl sau formamidă) la cald, sau enzimatic.

*Reacții de aglutinare* (prin extracția enzimatică a polizaharidului C) sunt cele mai utilizate după testul la bacitracină.

**Metoda latex-aglutinării** este tot o reacție de aglutinare pe lamă, dar în care anticorpul specific de grup are ca suport particule inerte de latex-polistiren, tehnica și interpretarea fiind similare cu coaglutinarea. Există în prezent o serie de companii producătoare de asemenea kituri care identifică principalele grupuri de streptococi implicați în patologia umană (A, B, C, D, F, G), de tipul STREPTOCOCCAL GROUPING KIT(Oxoid).

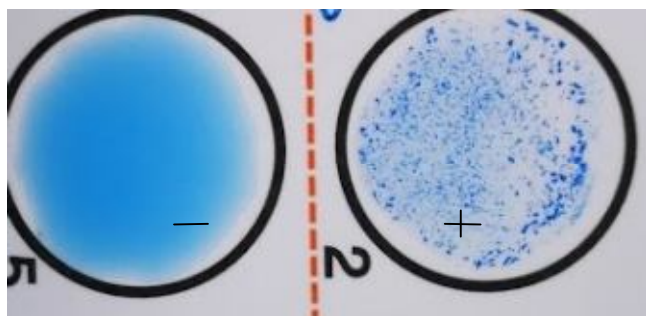


Figura 9: Identificarea grupului

Recent s-au introdus **teste imunologice rapide** de identificare a streptococului piogen direct din produsul patologic. Deși sunt mai costisitoare decât cultura pe geloză-sânge, ele prezintă avantajul rapidității în obținerea rezultatului (permit evidențierea antigenelor streptococice într-un interval de 10-15 minute, fără a impune apelarea la un laborator de bacteriologie). Dintre aceste teste menționăm: Ventrex, Directogen, Phadirect Strept A, Clearview etc.

**Testul de depistare rapidă a antigenului Streptococului beta hemolitic de grup A** este utilizat frecvent în practica clinică, în special în pediatrie, pentru identificarea germenului în faringite acute și începerea promptă a tratamentului antibiotic, înainte de rezultatele culturii clasice, care devin disponibile în 24-48 de ore. Sensibilitatea testului variază între 80-95%, iar specificitatea acestuia este de 98%. Obținerea unui rezultat pozitiv permite inițierea promptă a terapiei. Un rezultat negativ impune însă, în prezența simptomelor clinice, efectuarea culturii.

Testul mai poate fi folosit și la pacienții asimptomatici pentru depistarea stării de purtător. În această situație s-a demonstrat că această investigație are o valoare predictivă negativă în comparație cu cea a rezultatelor furnizate de cultură. Acest lucru se datorează faptului că în cazul unei colonizări bacteriene a faringelui încărcătura bacteriană este mică, iar testele pot fi negative datorită inhibării germenilor de către flora bacteriană normală.

Deși sunt specifice și sensibile, ele au eficacitate mai slabă decât cea a culturii în diagnosticul infecțiilor streptococice și depistarea purtătorilor. De aceea, cea mai sigură metodă de identificare a streptococilor piogeni rămâne cea bacteriologică.

Practic, laboratoarele de bacteriologie din țara noastră utilizează două metode de identificare a grupului serologic: testul la bacitracină pentru diferențierea streptococilor de grup A de cei non grup A și latex aglutinarea sau coaglutinarea pentru diagnosticul grupelor A, B, C, D, F, G de streptococi.

**Determinarea tipului** este necesară în scop epidemiologic la streptococii de grup A. Se poate efectua *tipajul M* (prin reacție de precipitare în tub) și *tipajul T* (prin reacție de aglutinare pe lamă). În țara noastră tipajul se efectuează la centrul de referință "Institutul Cantacuzino".

Pentru clasificarea germenilor non-M tipabili se utilizează metoda PCR.

Ca și în cazul stafilococilor, există în prezent **truse manuale, sisteme automatizate sau teste de biologie moleculară**, care identifică un număr mare de streptococi/enterococi cu o precizie mare.

Trusele API Strep (bio Mérieux) permit identificarea unui număr mare de streptococi/enterococi și utilizează 20 teste biochimice miniaturizate. Citirea acestor reacții se face cu ajutorul tabelului de citire, iar identificarea este obținută cu ajutorul programului soft dedicat identificării cu truse API.

**Sistemul Vitek 2** compact (bio Mérieux) de identificare și testare a sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a streptococilor, utilizând carduri de tip VITEK® 2 GP (pentru identificare) și respectiv AST-ST01 (pentru testarea sensibilității tulpinilor de *S. pneumoniae*, streptococi beta-hemolitici, streptococi viridans) într-un interval de 18-24 de ore. Este de asemenea disponibil sistemul Microscan.

**Sensibilitatea la antibiotice.** În cazul izolării streptococilor de grup A, antibiograma nu este necesară deoarece până în prezent nu s-au semnalat tulpini rezistente la penicilină. Pacienții alergici la penicilină pot fi tratați cu eritromicină. După identificarea serogrupului A prin testul la bacitracină, examenul bacteriologic se poate considera încheiat și se poate elibera buletinul de analiză cu rezultatul definitiv. La cerere, sau în cazul pacienților alergici, antibiogramele sunt opționale. În cazul izolării celorlalte grupuri de streptococi, precum și a streptococilor negrupabili, antibiograma este obligatorie.

**Diagnosticul serologic.** Datorită faptului că în evoluția complicațiilor post-streptococice tardive germenii sunt greu evidențiable în cultură, se urmărește determinarea anticorpilor antistreptococici prin teste serologice. Se pun în evidență anticorpii prezenți în ser atât față de componentele endocelulare cât și față de produșii extracelulari streptococici. Astfel se determină anticorpii:

- **anti-SLO (ASLO)**, fie prin reacție de neutralizare în tuburi (reacție de referință care utilizează ca indicator hematiile de iepure), fie printr-o metodă rapidă de aglutinare pe lamă. Reacția dă informații despre o infecție streptococică recentă, când se evidențiază creșterea în dinamică a titrului, despre eficiența terapiei antistreptococice, precum și asupra stadiului evolutiv al complicațiilor poststreptococice tardive. Este cea mai utilizată reacție de diagnostic serologic în infecțiile cu *S. pyogenes*.
- **anti-MAP**, prin reacție de latex-aglutinare, au valoare în diagnosticul retrospectiv al infecției acute, când titrul ASLO este normal sau crescut nesemnificativ. Se mențin mult timp în ser;
- **anti-C**, prin reacție de aglutinare, au evoluție similară cu anticorpii anti-MAP, prezența lor semnificând constituirea unei valvopatii cronice;
- **anti-DN-ază** au titrul crescut semnificativ în glomerulonefrita acută post-streptococică, spre deosebire de titrul ASLO, care în acest caz are valori mult mai mici;
- **anti-SK**, determinați prin test de neutralizare, au valori paralele cu titrul ASLO.



Evidențierea și titrarea anticorpilor ASLO se menține ca metodă de rutină. Numai în cazurile în care rezultatele reacției ASLO nu concordă cu suspiciunea clinică, se apelează la alte metode serologice. Utilizarea concomitentă a mai multor teste, crește șansa diagnosticului etiologic.

**Reacția ASLO.** Reprezintă metoda de rutină în serodiagnosticul infecțiilor streptococice produse de serogrupurile A, C, G. Este o reacție de neutralizare *in vitro* care se bazează pe proprietatea anticorpilor ASLO de a anihila efectul litic al antigenului (streptolizina O) asupra hematiilor (de iepure).

Reacția are loc în tuburi, în care se pun în contact diluții din serul de cercetat cu cantitatea standard (o unitate combinantă) de streptolizina O (SLO). După o scurtă perioadă de incubare necesară reacției specifice dintre Ac și Ag se adaugă suspensia de hematii ca mijloc revelator. În cazul existenței Ac în ser se produce neutralizarea SLO. Aceasta nu-și poate exercita acțiunea litică asupra hematiilor, ceea ce se traduce vizual prin lipsa hemolizei în tuburi (hematiile se depun în buton pe fundul eprubetelor). În eprubetele în care, la diluțiile respective, Ac sunt insuficienți pentru a neutraliza SLO, efectul litic al acestuia se observă prin prezența hemolizei.

*Interpretarea rezultatelor.* Titrurile normale ASLO se situează între 166-200 UI/ml. Ele variază în funcție de vârstă, arie geografică, sezon. Astfel, sub vârsta de 14 luni o infecție streptococică nu determină creșterea ASLO, iar sub 2 ani creșterile rămân nesemnificative. În infecțiile cutanate titrul ASLO este normal.

Titrul ASLO > 200 u/ml oferă informații despre:

- o *infecție streptococică* în *antecedentele recente* ale pacientului, când se înregistrează creșterea în dinamică a titrului. După o angină streptococică titrul ASLO crește în 2-3 săptămâni, atinge nivelul maxim la 5 săptămâni și scade apoi lent, până la 6-12 luni (în cazul în care boala se vindecă);
- instalarea sau agravarea unei *complicații poststreptococice*;
- *eficiența tratamentului.* Antibioticoterapia instituită precoce face că titrul ASLO să crească mai puțin, iar corticoterapia determină revenirea mai rapidă la valori normale. În infecțiile streptococice netratate titrurile ating valori maxime (până la 2500 u/ml);
- starea de purtător sănătos.

Valori fals pozitive se pot înregistra în hiperlipemii, hiper- $\gamma$ -globulinemii (mielom multiplu). Valori fals negative (ASLO normal) apar la 15-20% din totalul infecțiilor streptococice.

**Reacția ASO-LATEX** este o metodă rapidă de evidențiere a anticorpilor ASLO prin latex-aglutinare pe lamă. Se utilizează trusa ASO-LATEX comercializată în țara noastră, dar pot fi efectuate determinări bazate pe aceeași metodă folosind și alte truse, denumirea lor variind în funcție de firma producătoare. Kitul menționat servește la punerea în evidență pe lamă, a anticorpilor ASLO din ser nediluat (metoda calitativă) sau la determinarea semicantitativă a acestora.

Serul de cercetat se pune în contact, pe lamă, cu reactivul ASO-LATEX (suspensie de particule uniforme de latex, sensibilizate în prealabil cu SLO stabilizată). Particulele de latex fac posibilă observarea cu ochiul liber a reacției Ag-Ac.

Citirea se face după aproximativ 2 minute. Dacă serul de cercetat conține anticorpi ASLO în cantitate suficientă, suspensia își pierde aspectul omogen și aglutinarea particulelor devine evidentă. O granulație care depășește pe cea a controlului negativ indică prezența a cel puțin 200 UI ASLO/ml. Lipsa aglutinării indică un titru < 200 UI ASLO/ml.

Trusa conține de asemenea, un martor pozitiv (soluție de  $\gamma$ -globulină umană cu titrul ASLO > 200 UI/ml) și un martor negativ (soluție de  $\gamma$ -globulină umană cu titrul ASLO < 200 UI/ml).

### 1.3. *Streptococcus agalactiae* (streptococul de grup B)

*S. agalactiae* este un germen comensal al intestinului, vaginului, uretrei (la bărbat), perineului și căilor respiratorii superioare.

**Semnificația clinică.** *S. agalactiae* poate fi cauza unor infecții severe la nou-născuți și adulți. La nou născuți contaminarea are loc în timpul nașterii cu flora tractului genital matern. Infecțiile neonatale îmbracă două forme clinice, în funcție de calea și momentul contaminării. Forma predominantă precoce, la 10 zile după naștere este pneumonia, streptococul fiind de origine maternă, iar cea tardivă, la două săptămâni după naștere, meningita, de proveniență posibil nosocomială. Bacteriemia poate fi prezentă în ambele cazuri și prognosticul este nefavorabil.

La femei tinere provoacă infecții urogenitale, iar la bătrâni și imunodeprimați, meningite, infecții respiratorii, endo- și miocardite acute, septicemii.

**Recoltarea și examenul direct.** În general se recoltează secreții vaginale, cervicale și LCR.

**Izolarea și identificarea.** Se face pe geloză-sânge și geloză-chocolat. Se poate însămânța mai întâi pe mediu de îmbogățire Todd-Hewit (cu extract de drojdie, colistin și acid nalidixic) și apoi pe mediile solide menționate. După însămânțarea mediile se incubează la 37°C pentru 24 ore, în aerobioză sau în atmosferă cu CO<sub>2</sub>. Identificarea se bazează pe caracterele culturale și structura antigenică.

**Caractere culturale.** Pe geloză-sânge streptococii de grup B dezvoltă colonii ceva mai mari decât ale streptococilor de grup A, cu hemoliză variabilă.

**Structura antigenică.** Identificarea grupului se face prin metode screening și metode bazate pe reacții antigen anticorp (care vor fi pozitive pentru grupul B).

**Metode screening.** **Testul CAMP.** Hemoliza incompletă  $\alpha'$  reprezintă primul indiciu de recunoaștere a acestor germeni, pe ea bazându-se identificarea streptococilor de grup B prin testul CAMP. Streptococii de grup B produc o proteină termostabilă difuzibilă, numită CAMP-factor, care intensifică zona de hemoliză incompletă produsă de  $\beta$ -hemolizina unei tulpini de *S.aureus*. Testul se poate efectua prin:

- metoda convențională: pe o placă cu geloză-sânge se însămânțează în striuri perpendiculare tulpina de identificat și o tulpină de *S. aureus* producătoare de  $\beta$ -hemolizină;
- pe geloză-sânge se însămânțează cu ansa într-un striu unic tulpina de cercetat și la distanță de 3-4 mm de striu se depune un disc impregnat cu  $\beta$ -hemolizină stafilococică.

Placa însămânțată printr-una din cele două modalități se incubează în aerobioză sau în atmosferă de CO<sub>2</sub> și a doua zi se citește. La joncțiunea dintre zona de hemoliză  $\alpha'$  a streptococilor și hemoliza incompletă a stafilococului apare o zonă de hemoliză totală (test pozitiv). Testul este prezumptiv deoarece dă rezultate pozitive și la alte grupe de streptococi. De aceea identificarea streptococilor de grup B trebuie confirmată prin alte metode.

**Identificarea tipului.** La streptococii de grup B s-au descris până în prezent 5 tipuri antigenice după natura polizaharidului de tip (capsular sau de înveliș): Ia, Ib, Ic, II și III. Ele se identifică la centrul de referință Cantacuzino prin reacții de precipitare cu seruri hiperimune specifice de tip. Identificare se poate face și prin utilizarea de sisteme comerciale de tip API, Vitek, MALDI-TOF.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Testarea sensibilității este obligatorie (prin metoda difuzimetrică sau prin determinarea CMI pe carduri automate/semiautomate), mai ales datorită faptului că s-au semnalat tulpini tolerante sau chiar rezistente la penicilină. În formele grave penicilina poate fi înlocuită sau asociată cu un aminoglicozid.

### 2.3. Streptococii viridans

Streptococii viridans, denumiți și streptococi orali sunt comensali ai cavității bucale, intestinului, pielii și căilor genitale. Printre speciile care joacă un rol etiologic predominant în formarea cariilor dentare și a paradontopatiilor se numără *S.mutans*, *S.sanguis*, *S. anginosus* (*S. milleri*).

Streptococii viridans sunt identificați frecvent ca agenți etiologici ai endocarditei subacute. Pătrunși în circulație cu ocazia extracțiilor dentare, a intervențiilor în sfera ORL sau maxilo-facială și chiar a traumatismelor minore, se grefează la nivelul valvulelor cardiace la persoanele cu risc (cardiopatie valvulară) sau a protezelor valvulare. Diagnosticul endocarditei subacute se face prin hemoculturi.

*S. anginosus* este agent patogen întâlnit în infecții purulente (abcese, peritonite, pleurezii, artrite) și infecții neonatale (septicemii și meningite).

**Diagnosticul de laborator** al acestor afecțiuni este bacteriologic și se efectuează numai atunci când germeii se izolează din lichide organice care sunt în mod normal sterile.

**Izolarea** se face prin însămânțarea produselor biologice pe geloză-sânge. După incubarea plăcilor la 37°C, 24 de ore se examinează caracterele culturale. Prezența de colonii mici, cu hemoliza  $\alpha$  (viridans=verde) sugerează prezența streptococilor viridans sau a pneumococilor. Pentru precizarea diagnosticului se cercetează sensibilitatea la optochin și biloliza (teste de diferențiere cu pneumococii). Pentru stabilirea speciei se cercetează proprietățile biochimice (pe sistemul API Strep, carduri Vitek sau MicroScan). Streptococii viridans se pot identifica și prin excludere: nu sunt  $\beta$  hemolitici, sunt insolubili în bilă, nu sunt sensibili la optochin, nu au antigen de grup, nu tolerează NaCl 6.5%, nu cresc la 10°C și 45°C, majoritatea au testul la bilă esculină negativ. Când se evidențiază aceste particularități se confirmă prezența de streptococi viridans.

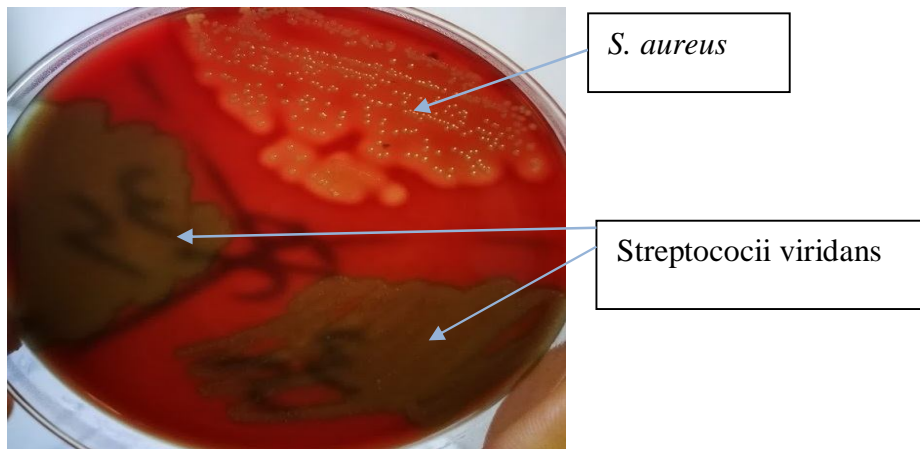


Figura 10: Cultură de *S. aureus* și streptococi viridans pe mediul solid geloză-sânge

### 1.4. *Streptococcus pneumoniae*

**Semnificația clinică.** Comensal al căilor respiratorii superioare la om, *S. pneumoniae* poate deveni virulent atunci când este încapsulat. Este principalul agent etiologic al meningitelor la copii și al infecțiilor respiratorii (pneumonia francă lobară, bronhopneumonii), infecțiilor ORL, septicemiilor, mai rar al uretritelor, etc. Diagnosticul acestor infecții este bacteriologic.

**Recoltarea.** Se recoltează spută, LCR, exudate, sângele etc., în funcție de localizarea infecției.

**Examenul direct macroscopic** este util în pneumonii, deoarece sputa are un aspect ruginiu caracteristic.

**Examenul microscopic** al frotiurilor colorate Gram din spută evidențiază PMN și diplococi gram pozitivi, lanceolați, dispuși în lanțuri scurte sau perechi izolate, încapsulați. Au aspect caracteristic, ca două flăcări de lumânare care se ating cu bazele.

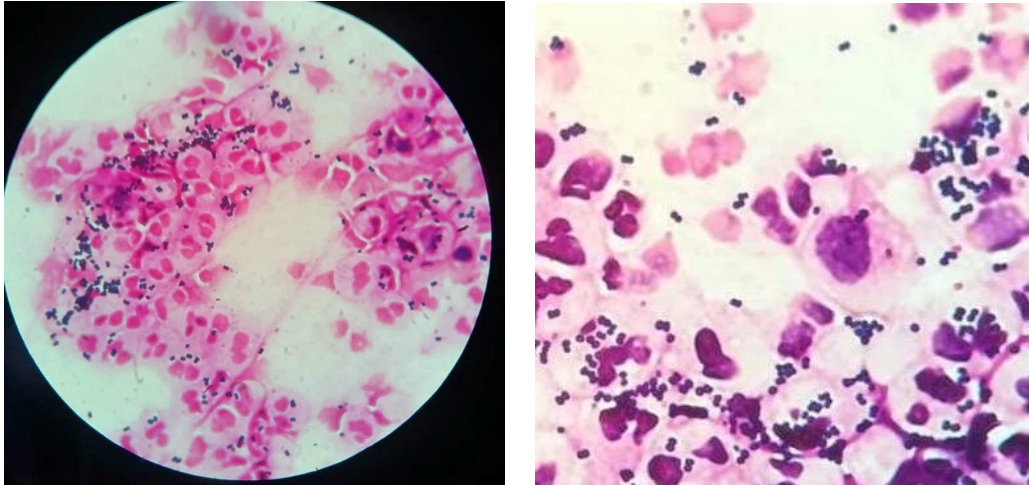


Figura 11: *S. pneumoniae*-examen microscopic din produs biologic

**Izolarea** se face pe geloză-sânge, iar incubarea de preferință în atmosferă de CO<sub>2</sub>, la 37°C, timp de 24 ore.

**Identificarea. Caractere culturale.** Pe geloză-sânge pneumococul dezvoltă colonii mici, netede, mucoide, cu diametrul în jur de 1 mm, cu zona de liză  $\alpha$  în jur. Coloniile tinere sunt bombate, dar prin învechire se aplatizează și au centrul deprimat datorită elaborării de autolizine. Aceste aspecte culturale (cu excepția proprietăților autolitice) se întâlnesc și la streptococii viridans, ceea ce impune efectuarea testelor de diferențiere.

**Testul la optochin.** Se repică în striuri dese pe o placă cu geloză-sânge câteva colonii izolate din tulpina de cercetat. În mijlocul ariei însămânțate se depune un microcomprimat de optochin. Se incubează 24 ore la 37°C. Testul este pozitiv (germenii sunt sensibili la optochin) dacă în jurul microcomprimatului de optochin cultura este inhibată pe o arie de minimum 20 mm. Este un test foarte specific, care diferențiază pneumococii (sensibili) de streptococii viridans (rezistenți la optochin).

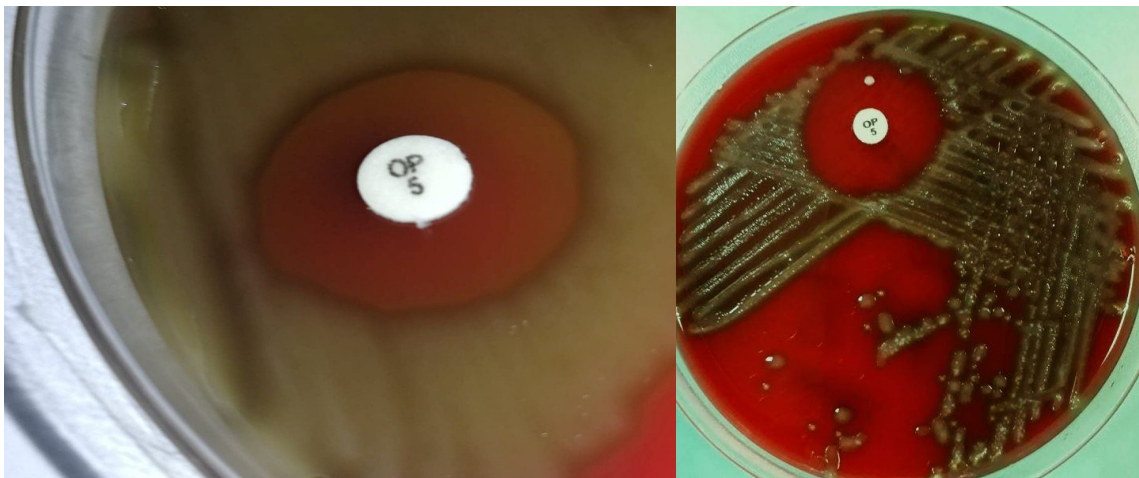


Figura 12: Testul la optochin pe geloză-sânge, hemoliză alfa

**Biloliza** (solubilizarea prin bilă sau săruri biliare). Se însămânțează tulpina de cercetat în două eprubete cu bulion glucozat. A doua zi se adaugă într-o eprubetă 1 ml bilă sau 1 ml săruri biliare (dezoxicolat sau taurocolat de Na 10%), iar în cealaltă eprubetă ser fiziologic (tub martor). După o oră de incubare la termostat se compară cele două eprubete. Dacă în bulion s-au dezvoltat pneumococi, tubul în care s-au adăugat săruri biliare se va limpezi, comparativ cu martorul care rămâne opac. Bila sau sărurile biliare favorizează elaborarea autolizinelor, care vor determina liza pneumococilor. În cazul streptococilor viridans, testul este negativ.

**Boala experimentală la șoarece.** Șoarecele alb este foarte sensibil la infecția cu *S. pneumoniae*. Se injectează la baza cozii tulpina de cercetat. Șoarecele face în 2 zile o septicemie mortală. Prin hemocultură se izolează *S. pneumoniae*, iar pe amprente din splină se văd diplococii incapsulați cu dispoziție caracteristică.

**Identificarea tipului serologic** se poate face fie direct din produsul patologic (dacă acesta este lichid), fie din cultura de 10-14 ore în mediu lichid (dar pe medii speciale pe care pneumococul poate sintetiza capsula).

Se utilizează reacția de aglutinare pe lamă prin **tehnica de “umflare a capsulei”**. Pe o lamă se pun în contact o picătură din cultura de cercetat sau produs patologic și o picătură din serul specific de tip. Operația se repetă pentru fiecare ser de tip. Apoi se adaugă câte o picătură de albastru de metilen la fiecare amestec Ag-Ac. După 10 minute se examinează la microscop, la obiectivul cu imersie.

Acolo unde tipul antigenic întâlnește serul omolog se observă aglutinarea pneumococilor și prezența unei capsule bine delimitate, mult mărită comparativ cu celelalte seruri.

Identificarea *S.pneumoniae* se poate face și prin utilizarea de galerii API Strep sau carduri automate de identificare de tip Vitek 2 GP.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Inițial *S.pneumoniae* a fost sensibil la penicilină. În prezent, cca 50% din tulpinile non-invazive (izolate din otite, sinuzite) și cca 30% din cele invazive (izolate din sedii sterile: sânge, lichid pleural, LCR) au o sensibilitate diminuată la penicilina G. Din acest motiv, este importantă testarea CMI prin testul E în infecții severe: septicemii, pleuro-pneumopatii, meningite, pentru ajustarea tratamentului antibiotic.

Conform CLSI, pentru testarea sensibilității la penicilină se utilizează comprimatului de oxacilină ca marker surogat. Tulpinile cu diametrul zonei de inhibiție la oxacilină  $\geq 20$  mm sau cu CMI  $\leq 0,06$   $\mu\text{l/ml}$  se consideră sensibile la penicilină. Atunci când diametrul la oxacilină  $\leq 19$  mm, se poate determina CMI la penicilină, cefotaxime, ceftriaxonă, deoarece aceste diametre pot

caracteriza tulpini sensibile, intermediar rezistente sau rezistente la penicilină. Testarea sensibilității se poate face nu doar prin metoda difuzimetrică, ci și prin determinarea CMI pe carduri automate de tip Vitek 2 AST-ST01. În cazul tulpinilor rezistente la penicilină, mecanismul de rezistență este reprezentat de modificarea PLP, care afectează nu numai penicilina G, dar și alte  $\beta$ -lactamine (penicilinele cu spectru larg: amoxicilina, sau cefalosporinele, de tipul cefotaxime).



Figura 13: *S. pneumoniae* antibiogramă difuzimetrică pe mediul solid geloză-sânge

### 1.5. Genul *Enterococcus*

Genul *Enterococcus*, intrat recent în taxonomie, include 12 specii, din care 10 s-au izolat în infecții umane: endocardite, infecții uro-genitale, meningite și infecții neonatale. A făcut parte din genul *Streptococcus*, grupul D și aglutinează cu serurile de grup D. Dintre speciile cu habitat uman, *E. faecalis* și *E. faecium* constituie grupul enterococilor care au capacitatea de a se dezvolta pe medii cu concentrații de NaCl 6,5% sau pe medii cu bilă 40%.

Izolarea se face pe geloză-sânge, coloniile fiind mici, cu hemoliză variabilă. Identificarea se bazează pe structura antigenică (enterococii au polizaharidul de grup D) și pe caracterele biochimice.

Genul *Enterococcus* este definit prin caractere ilustrate în tabelul următor:

Tabel 2: Caractere diferențiale ale tulpinilor de *Streptococcus* spp./ *Enterococcus* spp.

<i>Streptococcus</i> spp.	Tip de hemoliză	Bacitracină	Optochin	Test Camp
<b>Group A</b>	$\beta$	Sensibil	Rezistent	-
<b>Group B</b>	$\alpha, \beta, \gamma$	Rezistent		+
<b>Group D (Enterococi)</b>				
<i>Str. viridans</i>	$\alpha$		Sensibil	-
<i>Str. pneumoniae</i>				

**Identificarea** speciei în cadrul genului se face pe baza formării de acid din manitol, sorbitol și a hidrolizei argininei etc., precum și prin metodele automate de identificare de tip Vitek, Microscan MALDI-TOF, sau teste de biologie moleculară.

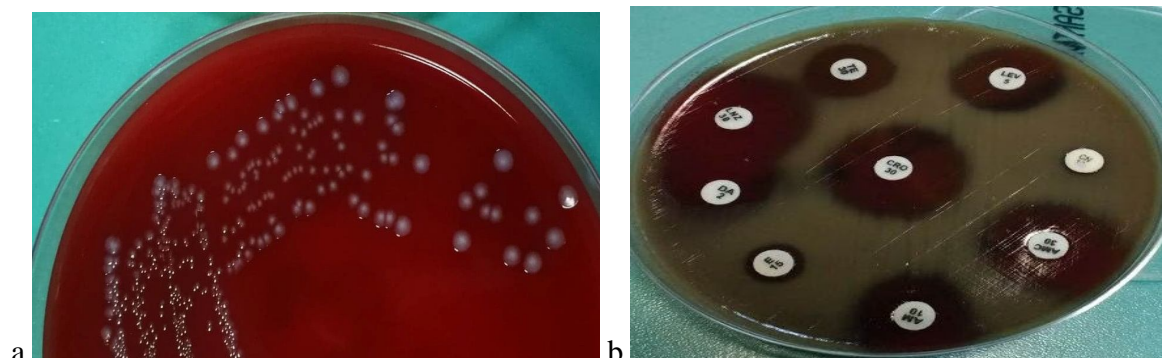


Figura 14: *Enterococcus* sp: (a) cultură, (b) antibiogramă difuzimetrică pe geloză-sânge

### Sensibilitatea la antibiotice

Enterococii au rezistență naturală față de cefalosporine, clindamicină, trimetoprim-sulfamethoxazol și aminoglicozide (fiind mult mai rezistenți decât streptococii). Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase se face prin metoda difuzimetrică, cu inocul de 0,5 McFarland, pe mediul Muller- Hinton (fără sânge), cu incubare aerobă la 35°C, timp de 18 +/- 2 h (pentru glicopeptide timpul de incubare crește la 24 de ore).

Se testează:

- sensibilitatea la peniciline
- rezistența de nivel înalt la aminoglicozide
- sensibilitatea la glicopeptide
- sensibilitatea la linezolid
- sensibilitatea la tigeciclină
- sensibilitate la fluorochinolone, nitrofurantoin –dacă enterococii au fost izolați din urină.

Se înregistrează o continuă creștere a procentului tulpinilor de *E. faecalis* și *E. faecium* rezistente la vancomicină (fenotip VRE). Rezistența la vancomicină este de natură plasmidică, asigurată de genele *vanA* și *vanB* și poate crea probleme în controlul infecțiilor nosocomiale, datorită transmiterii rezistenței și la alte tulpini.

### Interpretare fenotipuri:

- *vanA*: vancomicina și teicoplanina R
- *vanB*: vancomicina R, teicoplanina S

Pentru sceningul pacienților colonizați cu tulpini VRE se pot folosi medii selective cromogene de tip VRE agar.

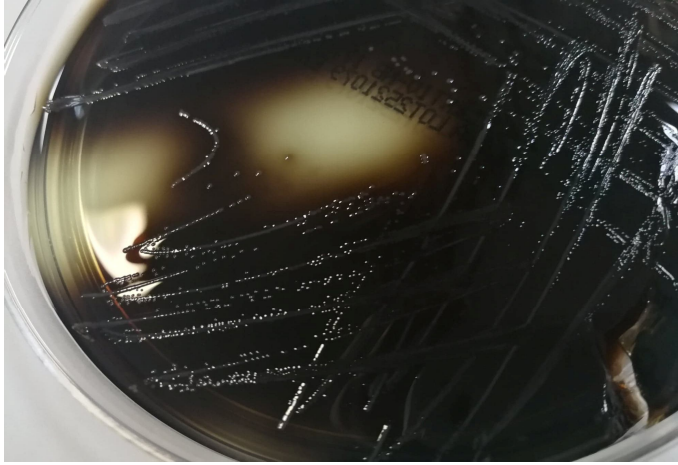


Figura 15: Test screening pozitiv pe VRE agar base

Identificarea la nivel de specie este importantă, întrucât există specii (*E.gallinarum*) cu rezistență naturală la vancomicină.

Chiar dacă sunt sensibili la vancomicină sau penicilină, nici unul din aceste antibiotice nu atinge concentrații serice eficiente terapeutic în infecțiile grave, ca de pildă, în endocardite. În tratamentul acestora se recomandă asocierea penicilinei sau a vancomicinei cu un aminoglicozid. Testarea sensibilității la antibiotice este utilă, datorită apariției tulpinilor rezistente prin plasmide.



### 3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE genul NEISSERIA

Familia *Neisseriaceae* cuprinde 15 genuri, printre care *Neisseria*, *Eikenella*, *Kingella* și altele. Membrii ai genurilor *Moraxella* și *Acinetobacter*, inițial încadrați în această familie au fost transferați în familia *Moraxellaceae*. *Moraxella* (fostă *Branhamella*) *catarrhalis* este clasificată ca specie a genului *Moraxella*.

Neisseriile sunt coci gram negativi, immobili, nesporulați, reniformi, dispuși de obicei în diplo cu concavitățile față în față. Uneori pot fi dispuși în tetrade sau aglomerări. Speciile patogene posedă capsulă, vizibilă numai pe preparatele proaspete, la germenii recent izolați și, spre deosebire de speciile saprofite, sunt foarte puțin rezistente în mediul extern.

Din punct de vedere al necesităților nutritive sunt germeni pretențioși și cu o temperatură optimă de dezvoltare între 35-37°C. Sunt germeni oxidază și catalază pozitivi. Neisseriile sunt bacterii comensale ale mucoaselor omului și animalelor cu excepția *N. gonorrhoeae*, care nu face niciodată parte din flora normală și care este agentul etiologic al gonoreei. *N. meningitidis*, care este de asemenea înalt patogenă, poate fi izolată însă și din faringele persoanelor sănătoase.

#### 3.1. *Neisseria gonorrhoeae*

**Semnificația clinică.** *Neisseria gonorrhoeae* este agentul etiologic al infecției gonococice (gonoreea), boală larg răspândită pe cale sexuală, interesând mucoasa aparatului genital atât la femei cât și la bărbați.

*N. gonorrhoeae* este foarte sensibil la variațiile mediului extern, nesupraviețuind în afara gazdei umane, decât o perioadă scurtă de timp. Transmiterea este directă, interumană, prin contact sexual.

Cea mai frecventă manifestare a infecției gonococice la bărbat este uretrita acută care debutează după o perioadă de incubație de 2-7 zile cu secreție uretrală abundentă și disurie. Netratată sau incorect tratată, uretrita acută se cronicizează și produce complicații, cum sunt stricturile uretrale, prostatita, epididimita etc. Doar 1-5% din uretrite sunt clinic asimptomatice. La homosexuali este obișnuită și rectita gonococică.

La femeie, gonococul produce endocervicita care se însoțește de o secreție vaginală purulentă și disurie. Cele mai multe cazuri la femei sunt, însă, asimptomatice, ceea ce este foarte important din punct de vedere epidemiologic. Infecția progresează ascendent producând salpingită, pelviperitonită și în final, uneori, boala inflamatorie pelvină. Salpingita gonococică duce la sterilitate feminină secundară.

La un procent scăzut de pacienți, gonococul poate disemina hematogen producând infecția gonococică diseminată, care se manifestă prin artrite unice sau multiple, rash cutanat etc. Se pare că formele diseminate sunt date cu precădere de tulpini de gonococ care se deosebesc de cele clasice prin faptul că rezistă la acțiunea bacteriolitică a serului.

*Nou-născuții* ai căror mame au infecție gonococică, pot face la naștere oftalmie gonococică, ce trebuie tratată imediat deoarece duce la orbire. În general, la naștere, se practică profilaxia oftalmiei cu penicilină sau azotat de argint.

**Recoltarea.** Produsul patologic este reprezentat de secrețiile exudative ale mucoaselor inflamate. Acestea au un aspect purulent, sunt cremoase, opace, cu o tentă gălbuie și se desprind ușor de mucoase.

Produsul recoltat depinde de sex, de practicile sexuale individuale și de sediul infecției.

*Secreția endocervicală* este recoltată de ginecolog. După introducerea valvelor, se îndepărtează mucusul de pe colul uterin și se inseră ferm un tampon în col. Tamponul se va roti câteva secunde. Se recoltează separat tamponurile pentru examenul microscopic și pentru însămânțare.

*Secreția uretrală* se recoltează la bărbați dimineața înainte de urinare sau la cel puțin 1h după ce pacientul a urinat. În uretritele acute, recoltarea se face direct cu un tampon, sau chiar cu ansa, deoarece secreția este abundentă. În formele cronice sau în cele asimptomatice recoltarea se face fie prin raclarea mucoasei uretrale cu ansa, fie cu un tampon special, ce se introduce în uretră cam la 2 cm și se rotește.

În formele de infecție diseminată oricare zonă a mucoasei poate fi colonizată cu gonococi. De aceea exudatul faringian, secreția rectală, lichidul sinovial (în artritele septice) și sângele pot fi prelevate și supuse diagnosticului bacteriologic.

**Transportul probelor.** Ideal este ca produsul să fie însămânțat direct după recoltare, deoarece gonococii, pe lângă faptul că sunt foarte sensibili la condițiile mediului extern, se găsesc în număr mic în produsele recoltate. Dacă însămânțarea nu este posibilă, se utilizează medii de transport de tip Stuart sau Amies. Atunci când transportul durează mai mult timp, sunt necesare medii nutritive complexe tip Ganoline duo care este în același timp și mediu de cultivare.

**Examenul direct** microscopic este o etapă foarte importantă în diagnosticul infecțiilor gonococice. Frotiurile se colorează Gram (sau cu albastru de metilen). În *uretritele acute, la bărbați*, sensibilitatea acestei metode de diagnostic este de peste 95%. În multe laboratoare, diagnosticul uretritei acute se oprește aici, renunțându-se la izolarea gonococului. Pe frotiu se vede un număr mare de PMN care conțin diplococi gram negativi dispuși ca două boabe de cafea, care se privesc prin concavitățile lor. În uretritele cronice, însă, cultivarea este obligatorie, diagnosticul pe frotiu direct fiind foarte dificil din cauza florei microbiene asociate.

*La femei*, examenul microscopic direct al frotiurilor din colul uterin, ca metodă de diagnostic, are o sensibilitate de doar 50-70%. Pe frotiu se văd multe PMN, diplococii caracteristici intracelulari, dar interpretarea frotiului este îngreunată de flora vaginală asociată, care seamănă cu neisseriile. Cultura este și în acest caz obligatorie.

Frotiurile efectuate din secreția rectală au valoare atunci când recoltarea se face sub control rectoscopic. Ca și în cazul secreției endocervicale izolarea este obligatorie.

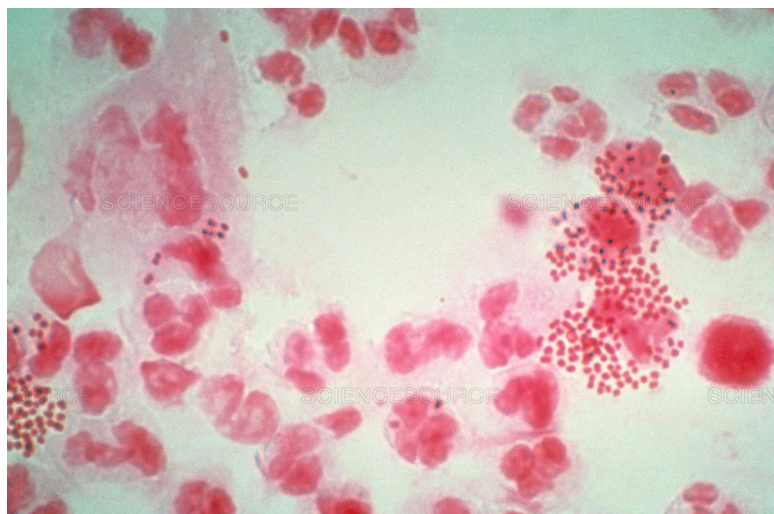


Figura 16: *Neisseria gonorrhoeae*: Examen microscopic din produs biologic

**Izolarea.** *Neisseria gonorrhoeae* este un germen foarte pretențios. Izolarea gonococilor se face pe geloză sânge-chocolat. Pentru a îmbunătăți dezvoltarea lor, s-au preparat medii selective prin adăugarea la geloză-chocolat a unor antibiotice la care gonococul este în mod natural rezistent. Un astfel de mediu, foarte utilizat la izolarea neisseriilor patogene, este mediul Thayer-Martin (care conține vancomicină pentru cocci gram pozitivi, colistin pentru bacilii gram negativi, trimetoprim pentru bacilul proteus și nistatin pentru fungi). Alte medii selective utilizate: mediul Martin-Lewis (Lincomicină), NYC-agar (Colistin, Vancomicină, Amfotericină B, Trimetoprim), Chocolat PolyVitex (Colistin și Trimetoprim), Chocolat PolyViteX VCN (Vancomicină, Colistin și Nistatin), etc. Incubarea se face la 37°C în atmosferă umedă cu CO<sub>2</sub>, timp de 24-48 ore.

**Identificarea.** Coloniile de gonococ se examinează cel mai bine sub lupă. După 24 h au un diametru de 0,5-1 mm, sunt transparente, ușor gri, lucioase, cu marginile netede. În timp gonococii produc 5 tipuri de colonii, notate de la T1 la T5. Coloniile T1 și T2 se obțin direct din materialul clinic, sunt colonii tinere, cu germeni piliați și reflectă lumina. Prin repicare se transformă în colonii T3-T5 care sunt mai mari, opace și nu reflectă lumina.

Pentru identificare se efectuează **testul oxidazei, pozitiv** la neisserii și un preparat colorat Gram din colonii. Pe acest preparat se observă coci gram negativi dispuși caracteristic, în diplo.

Confirmarea diagnosticului se face prin:

- fermentarea zaharurilor (gonococul fermentează doar glucoza): CTA test, API NH, etc.
- teste de degradare cromogenă a unui substrat de către enzimele gonococice: Gonocek II test,
- metode ce au la bază reacții ag-ac: imunofluorescența cu anticorpi monoclonali, coaglutinarea, Gono Gen II, ELISA,
- metode automate de identificare: rapid ID NH System , Vitek, MicroScan,
- teste PCR: NAATs ( Nucleic Acid Amplification Tests) – test screening pentru infecții genitale asimptomatice (în special când se suspicionează asociația *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis*).

Tabel 3: Caractere diferențiale ale *Neisseria* sp. și *M. catarrhalis*

		<i>N. meningitidis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
Producere de acid	glucoza	+	+	-
	maltoza	+	-	-
	lactoza	-	-	-
	fructoza	-	-	-
	sucroza	-	-	+
Oxidaza		+	+	+
H <sub>2</sub> S		-	-	+
CO <sub>2</sub> pentru izolare		foarte important	important	variabil

**Sensibilitatea la antibiotice.** În ultima perioadă au apărut tot mai multe tulpini de *N. gonorrhoeae* rezistente la penicilină, tetraciclină, chiar și la spectinomycină (un aminoglicozid cu spectru foarte îngust care cuprinde numai gonococul) și fluoroquinolone. În cazul tulpinilor producătoare de penicilaze, rezultate bune se obțin după administrarea de cefalosporine de generația a 3-a (ceftriaxonă). Cu toate acestea s-au identificat gene ce codifică o rezistență de nivel crescut chiar și la ceftriaxonă. De aceea, pentru fiecare izolat este obligatorie antibiograma și depistarea tulpinilor producătoare penicilază, nu atât pentru tratament, cât pentru supravegherea tulpinilor circulante într-o anumită populație.

## 1.6. *Neisseria meningitidis*

**Semnificația clinică.** Rezervorul de meningococ este omul. Meningococul poate fi izolat din oro și nasofaringele persoanelor sănătoase (15%) unde persistă în general câteva săptămâni, rezistența sa în mediul extern fiind foarte scăzută. Homosexualii sunt purtători în proporție de 40%. Transmiterea interumană se face prin picăturile lui Pflügge. În anumite situații, mai ales la copii, meningococul diseminează producând meningita cerebrospinală și septicemia. Meningococemia și meningita meningococică sunt infecții foarte grave, care amenință viața pacientului și care în cazul supraviețuirii se pot solda cu sechele neuroase.

Datorită antigenului somatic capsular și a proteinelor membranei externe, meningococii sunt împărțiți în 13 serogrupuri: A (cel mai patogen), B, C, D, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y, și Z. Grupul A este responsabil, în general, de epidemiile de meningite pe când grupul B, mai degrabă, de meningitele din perioadele interepidemice. Diagnosticul de laborator este bacteriologic.

**Recoltarea și transportul probelor.** În meningite se recoltează în primul rând LCR, înainte de a se administra antibiotice și se transportă rapid la laborator, ferit de variațiile de temperatură și lumină. Examinarea trebuie efectuată în maxim 1-2 ore de la prelevare, deoarece numărul PMN-urilor scade cu aprox 50-60% din valoarea inițială, după acest interval de timp. Prelevarea LCR se face prin rahicenteză lombară (L4-L5) sau suboccipitală în condiții aseptice, fiind de competența medicului infecționist, neurolog sau neurochirurg.

Se recomandă, de asemenea, recoltarea sângelui pentru hemocultură, a exudatului nazofaringian și a probelor bioptice de la nivelul leziunilor cutanate.

*Examenul macroscopic.* Urmărește transparența, culoarea și fluiditatea LCR. Normal acesta este limpede, incolor și fluid ca apa. *Aspectul* opalescent în stadiile inițiale, devine ulterior turbure, datorită conținutului mare de celule inflamatorii ( $>10^3/\text{mm}^3$ ), majoritatea PMN. *Culoarea* poate avea o tentă gălbui-gri. *Fluiditatea* poate fi similară apei, iar probele purulente sunt vâskoase.

*Examenul microscopic.* Din sedimentul obținut prin centrifugarea LCR se efectuează frotiuri colorate Gram, iar din supernatant se păstrează 1 ml pentru eventuala evidențiere directă a antigenelor meningococice. Examinarea microscopică relevă frecvente celule inflamatorii (cu predominanța polimorfonuclearelor) și prezența cocilor gram negativi caracteristici (reniformi, în diplo cu concavitățile față în față) situați frecvent intracelular și extracelular. Prezența leucocitelor în număr mare pledează pentru un prognostic favorabil. Frotiurile se examinează timp de cel puțin 10 minute.

*Latex- și coaglutinarea.* Există kituri de latex și coaglutinare care evidențiază printr-un reactiv polivalent direct din LCR, antigenele meningococice ale serogrupelor A,C,Y, W135 și separat antigenul serogrupului B. Rezultatul pozitiv al uneia din aceste reacții permite medicului începerea imediată a tratamentului antiinfecțios.

**Izolarea.** Prelevatele contaminate de tipul exudatului nazo-faringian se însămânțează de obicei pe două medii: unul neselectiv tip geloză-sânge sau geloză-chocolat, iar celălalt selectiv cu adaos de antibiotice (care inhibă flora de asociație) ca: agarul Thayer-Martin, NYC-agar, Chocolat PolyVitek sau Chocolat PolyVitek VCN, etc.

Sedimentul din LCR se însămânțează pe medii de cultură neselective tip geloză-chocolat sau un mediu selectiv cu adaos de antibiotice. Incubarea se face la 37°C, în atmosferă de 3-10% CO<sub>2</sub>, umiditate 50%, timp de 24-48 ore.

Sângele pentru hemocultură se însămânțează direct pe flacoanele pentru hemocultură care conțin mediu lichid. Flacoanele pozitive sunt semnalizate sonor și vizual. Fiind un sistem complet automat, flacoanele sunt monitorizate la fiecare 10 minute, ceea ce permite detectarea imediată a

flacoanelor pozitive. Protocolul de monitorizare este de 7 zile, dar dezvoltarea microorganismelor poate fi detectată uneori după doar 8 ore.

**Identificarea.** Pe geloză-sânge meningococii se dezvoltă sub forma unor colonii ușor gri, nepigmentate, transparente, convexe, lucioase de tip S (smooth), cu diametrul de cca 1 mm. Grupul A și C încapsulate au aspect mucoid. Pe geloză-chocolat coloniile sunt gri-opace. Coloniile tinere se emulsionează ușor în ser fiziologic, iar pe măsura îmbătrânirii lor se autolizează devenind rugoase. Identificarea acestor colonii se bazează pe aspectul morfologic pe frotiuri colorate Gram și prin *testul oxidazei* care este pozitiv.

*Testul oxidazei:* Pe suprafața coloniilor suspecte se depune o picătură de soluție apoasă 1% de tetrametilen-p-parafenilendiamină preparată extemporaneu. Testul este pozitiv dacă coloniile devin roz, apoi roșu purpuriu și se înnegresc după 10-20 secunde. Testul poate fi efectuat și prin depunerea coloniilor pe o hârtie de filtru impregnată cu același reactiv. Apariția unei culori albastre în 3-10 secunde indică pozitivitatea testului.

*Fermentarea zaharurilor.* Identificarea speciei *N.meningitidis* se face pe baza fermentării zaharurilor. Meningococul fermentează glucoza și maltoza, fără producere de gaz și nu fermentează levuloza, lactoza și zaharoza.

Se cunosc o serie de sisteme comerciale de identificare, bazate pe caractere exoenzimice, ce permit identificarea neisseriilor în intervalul 30 minute – 2 ore: Quad Ferm + (BioMerieux), Gonocek II, RIM (Rapid Identification Method), Minitek, API NH, CTA test, Rap IDHN (kit-uri care diferențiază neisseriile de alți coci /cocobacili Gram negativi), sistemele automate Vitek (carduri NHI), MicroScan (HNID), etc.

*Identificarea serogrupului* se face prin reacția de aglutinare pe lamă cu ser antimeningococic polivalent și apoi cu seruri monovalente de grup (A, B,C). Are importanță pentru supravegherea epidemiologică.

*Testele rapide de identificare* bazate pe tehnicile de polimerizare: NAATs (nucleic acid amplification tests) ce utilizează amplificarea ADN-ului prin metoda PCR (polymerase chain reaction assay). Alte metode rapide de identificare se bazează pe: imunofluorescența cu anticorpi monoclonali antimeningococici și metodele imunoenzimice EIA (enzime immunoassay) și contraimmunoelectroforeza (CIE).

**Sensibilitatea la antibiotice.** În tratamentul meningitei se administrează beta-lactamine, la care meningococii și-au păstrat sensibilitatea. Se preferă cefalosporinele de generația a 3-a (ceftriaxonă și cefotaximă) la debutul bolii. S-a raportat, însă, apariția sporadică a unor tulpini producătoare de beta-lactamază. În formele severe și meningococemii se folosește meropenem. În cazul persoanelor alergice la beta-lactamine se administrează cloramfenicolul.

Profilaxia contactilor se face cu rifampicină (timp de două zile). Ca alternativă se poate administra ceftriaxonă, ciprofloxacina sau spiramicina.

## 4. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE BACILI GRAM POZITIVI AEROBI

### 4.1. Genul *Corynebacterium*

Cuprinde un grup heterogen de bacterii, ce face parte din familia *Actinomycetaceae* în cadrul căroră se distinge în primul rând specia *C. diphtheriae*, specie înalt patogenă care produce difteria și o mare varietate de bacili gram pozitivi (numiți difteroizi), nesporulați, aerobi și facultativ anaerobi, imobili, catalazo-pozitivi și cu aspect caracteristic de litere chinezești, majuscule etc. Specii înalt patologice pe lângă *C. diphtheriae*, sunt și *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*, deoarece sunt singurele specii care pot secreta toxina difterică, având în comun și unele caractere biochimice.

**Semnificația clinică.** Difteria este o toxiinfecție produsă de *Corynebacterium diphtheriae* care se manifestă în forma ei caracteristică printr-o leziune la poarta de intrare, cel mai frecvent la nivelul amigdalelor, unde produce un exudat fibros aderent (“falsa membrană”) asociată cu fenomene toxice generale, datorită difuzării în organism pe cale hematogenă a toxinei specifice. O formă specială de difterie este “difteria plăgilor”. Aceasta se observă, rar, la nou-născuți (difteria cordonului ombilical), la nivel vaginal sau pe răni (în zonele tropicale) etc.

*C. ulcerans* produce mastite la vite de unde se transmite prin lapte la om, care poate face o boală asemănătoare difteriei.

*C. pseudotuberculosis* este un comensal al animalelor (oi, cai) de unde se transmite fie prin lapte, fie prin contact direct la om. Boala are manifestări asemănătoare difteriei.

La aceste specii se adaugă corynebacteriile comensale, care populează pielea, mucoasele tractului respirator superior, gastro-intestinal și uro-genital ca, de pildă *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. jeikeium* (un grup de corynebacterii multirezistente la antibiotice) *C. minutissimum*, *C. genitalium* și multe altele. Aceste specii comensale pot produce infecții în anumite condiții în care ele se manifestă ca germeni oportuniști. În ultimii 15 ani incidența infecțiilor produse de aceste corynebacterii a crescut considerabil. În consecință, se recomandă identificarea lor ori de câte ori sunt izolate din produse natural sterile și posibil implicate în etiologia unei infecții. Există kituri de identificare rapidă ca, de pildă, trusele API® CORYNE (Biomérieux).

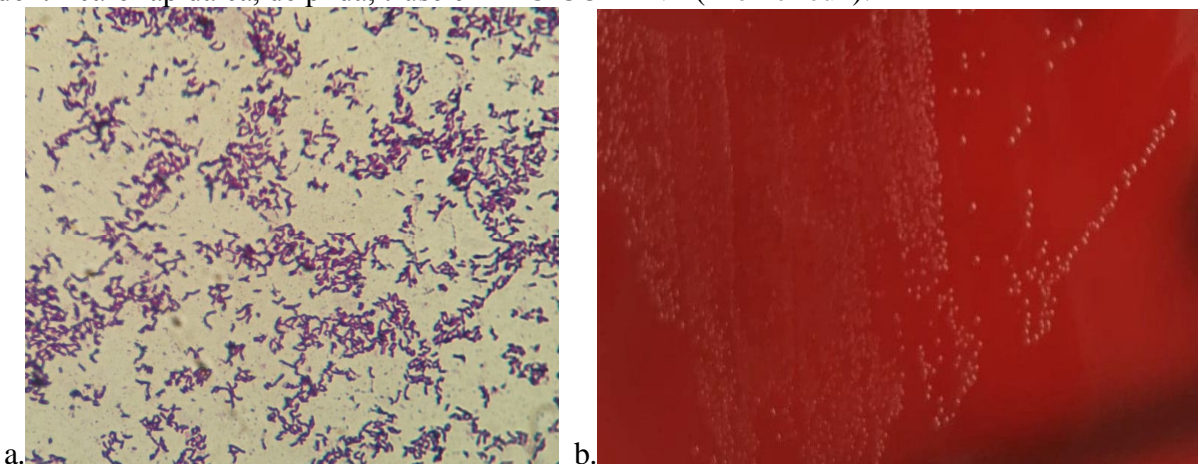


Figura 17: *Corynebacterium* sp.: (a) examen microscopic din cultură-clorație Gram, (b) cultură pe geloză-sânge

## *Corynebacterium diphtheriae*

**Recoltarea.** Diagnosticul de laborator urmărește confirmarea diagnosticului clinic de boală și a stării de purtător prin izolarea și identificarea bacilului difteric din produsele patologice și evidențierea potențialului toxigen. Fiind o toxiinfecție, diagnosticul trebuie să fie foarte rapid. Se recoltează exudat faringian, exudat nazal, exudat din plagă (în cazul difteriei cutanate).

Localizarea cea mai frecventă a falselor membrane o întâlnim la nivelul amigdalelor și a faringelui. De aici, din straturile profunde ale depozitului se va recolta secreție cu mai multe tampoane faringiene. La purtători, se va recolta secreția nazală cu tampoane flexibile de alginat, cu care să se poată pătrunde până pe pereții posteriori ai nazofaringelui. Probele se transportă pe medii de transport obișnuite Stuart sau Amies. Dacă prelucrarea se face după 24 de ore de la recoltare, se însămânțează tampoanele în mediu de îmbogățire cu telurit, ca de pildă OCST (ou, cisteină, ser, telurit).

**Examenul direct.** *Examenul microscopic* al secreției faringiene nu are valoare diagnostică, întrucât bacilul difteric nu poate fi deosebit pe baza caracterelor sale morfologice de corynebacteriile comensale care populează mucoasa respiratorie superioară. El are o valoare orientativă în cazul în care diagnosticul clinic este evident.

**Izolarea.** Probele recoltate se însămânțează pe geloză-sânge și pe medii selective ce conțin telurit, cum sunt mediul Tinsdale și Gundel -Tietz. Dacă nu avem medii selective, se aplică pe geloză-sânge un microcomprimat de fosfomicină care va inhiba dezvoltarea florei asociate.

Dacă tampoanele nu au fost introduse inițial în mediu de îmbogățire OCST, se însămânțează și pe mediul Löffler (conține ser coagulat de bou) pe care bacilul difteric se dezvoltă foarte bine. În final tampoanele se introduc într-un mediu lichid, ce conține ser și sânge, pentru 24h, iar apoi se fac subculturi pe mediile cu telurit.

**Identificarea.** *Examenul microscopic* al coloniilor crescute pe mediul Löffler arată prezența corynebacteriilor, care sunt bacili gram pozitivi la limită, dreți sau ușor încurbați, cu capetele măciucate, între 2-6μ lungime, grupați sau în grămezi cu forme asemănătoare literelor chinezești sau majusculilor. Morfologia poate, însă, să îmbrace aspecte diferite, bacilii putând avea capetele ascuțite, dimensiuni mai mici etc.

### Caractere culturale

- > pe geloză-sânge bacilul difteric dezvoltă colonii albe gri-perlate care uneori sunt înconjurate de o zonă mică de hemoliză;
- > pe mediul Tinsdale *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis* apar sub forma unor colonii mici, cenușii-negre care prezintă uneori un halou cafeniu, ce se intensifică după 48 ore de incubație la 37°C. Haloul este rezultatul reacției dintre teluritul de potasiu și H<sub>2</sub>S produs de aceste corynebacterii din L-cistina din mediu și este constituit dintr-un precipitat de sulfură de telur. Diferimorfii, dacă nu sunt inhibați de mediu, dau colonii mari negre, lipsite de halou;
- pe mediul Gundel Tietz - bacilii difterici apar sub formă de colonii friabile de culoare neagră intensă (datorită metabolizării teluritului de potasiu din mediu, în telur metalic). Aspectul coloniilor de pe mediul Gundel-Tietz, examinate la lupă, permite orientarea cu privire la biotipul de bacil difteric. Tipul *gravis* produce colonii negre, plate, cu suprafața rugoasă, ombilicate, cu striuri radiare și margini crenelate (aspect de floare de margaretă). Tipul *intermedius* dă colonii negre, plate, cu centrul acuminat și mai închis la culoare, cu margini regulate. Tipul *mitis* are colonii negre, rotunde, cu margini regulate, suprafața netedă și lucioasă;
- pe mediul Löffler bacilii difterici produc colonii albe cremoase.

Coloniile suspecte se trec obligatoriu pe mediul Löffler, identificarea efectuându-se pe germeii crescuți numai pe acest mediu.

La **examenul microscopic** pe preparate colorate Del-Vecchio, Neisser sau Gram se evidențiază granulele metacromatice sau corpusculii Babeș Ernst. În colorația Del Vecchio, corpul bacterian apare colorat galben deschis iar granulele de volutină în brun-verzui. Bacilii difterici au 2-5  $\mu\text{m}$  lungime, sunt Gram-pozitivi la limită (la o decolorare de 7-8 secunde bacilii difterici se pot decolora și apoi recolora cu fuxină), sunt nesporulați, neîncapsulați, imobili, cu o dispoziție caracteristică de litere chinezești sau majuscule, X, L, V etc. Cele trei biotipuri au aspect diferit la examenul microscopic. Tipului *mitis* îi corespunde descrierea de mai sus. Tipul *intermedius* este foarte pleomorf, bacilii fiind lungi. Tipul *gravis* prezintă de obicei bacili scurți, cocoizi sau piriformi ce seamănă mai degrabă cu diferimorfii decât cu bacilii difterici.

Identificarea de precizie se face prin teste biochimice, dintre care cele mai importante sunt fermentările de zaharuri. Se mai cercetează prezența cistinazei, care este pozitivă la bacilul difteric și a ureazei care lipsește.

**Toxigenza.** Stabilirea potențialului toxigen este obligatorie la toate tulpinile de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* și *C. pseudotuberculosis*. Testarea se face cel puțin din 10 colonii, deoarece la același pacient pot fi prezente și tulpini netoxigene. Toxigenza se poate evidenția *in vivo* prin inoculare la cobai, precum și *in vitro* prin testul Elek.

*Testul de toxigenză "in vivo"* (boala experimentală) se realizează pe cobai.

*Testul de toxigenză "in vitro"* (Elek). Testul se efectuează în plăci petri cu mediu Elek (geloză cu ser de bou). Se decupează pe diametrul plăcii un șanț în care se introduc 0,5 ml ser antidifteric nefenolat (antitoxină difterică). După absorbția serului, șanțul se plombează cu geloză. Se face însămânțarea cu cultură microbiană de pe mediul Löffler, perpendicular pe șanțul cu antitoxină difterică. Concomitent se însămânțează și o tulpină martor, sigur toxigenă. Se incubează 24 ore la temperatura de 37°C. Tulpina de cercetat este toxigenă dacă în unghiul format de linia de cultură și șanț apare o linie de precipitare (imunodifuzie radială dublă), linie obligatorie și la tulpina martor. Liniile de precipitare se intensifică prin păstrare la frigider. Spre deosebire de testul *in vivo*, care deosebește toxinele secretate de cele 3 specii, în testul Elek nu există interferență.

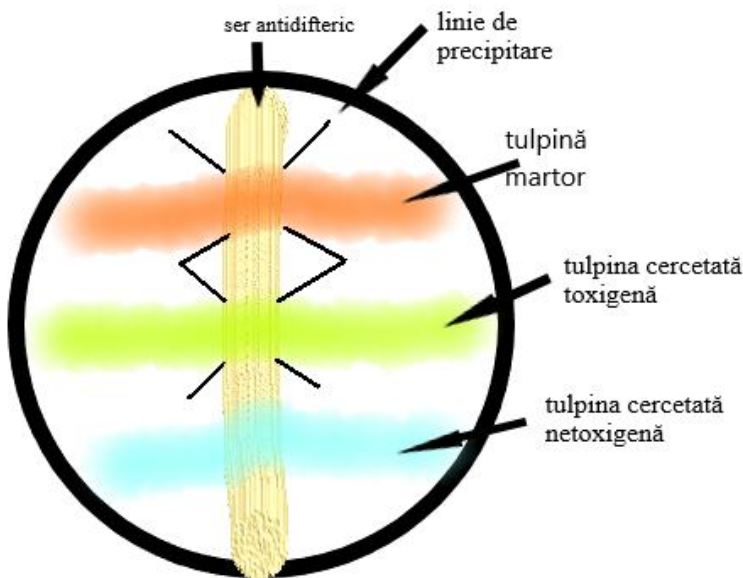


Figura 18: Testul Elek



Toxigenza se poate cerceta și pe culturi de celule, în care toxina difterică produce un efect citotoxic la 24 de ore.

**Diagnosticul serologic** se realizează prin reacția de hemaglutinare pasivă, când pe hematii se absoarbe toxina difterică, fiind astfel transformată în Ag macromolecular; hematiile se pun în contact cu serul de cercetat, aflat în diluții:

- reacție (+): depozitarea neregulată a hematiilor pe fundul eprubetei.
- reacție (-): depozitarea regulată a hematiilor "în buton".

**Sensibilitatea la antibiotice.** *C. diphtheriae* este sensibil la toate antibioticele active față de bacteriile gram pozitive (penicilină, vancomicină, eritromicină etc.), în schimb la sulfamide majoritatea au devenit rezistenți. Tratamentul difteriei este, însă, imunologic, cu antitoxină care să neutralizeze toxina secretată de germen. Totuși, antibioticele se administrează atât bolnavilor precum și contacților, în scopul limitării transmiterii infecției.

## 4.2. Genul *Listeria*

Germeii din genul *Listeria* sunt bacili gram pozitivi, aerobi, nesporulați, cu dimensiuni cuprinse între 0,4-0,5 μm diametru și 0,5-2 μm lungime, cu capetele rotunjite, neramificați, dispuși în palisade, sub forma literei "V", sau în lanțuri. Prezintă flageli peritrichi în număr de 1-5, care le asigură o mobilitate caracteristică "în piruetă".

Genul *Listeria* cuprinde 7 specii împărțite în două mari grupuri. Mai importante din punctul de vedere al patogeniei la om sunt: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* și *L. ivanovii*.

**Semnificația clinică.** Infecțiile cu germeni din genul *Listeria* pot apare sub forma unor cazuri sporadice sau focare epidemice. Ultimele focare epidemice sugerează faptul că listerioza este de fapt o toxiiinfecție alimentară, cea mai frecventă cale de transmitere a bolii fiind în prezent cea alimentară. Alimentele cel mai frecvent implicate în focarele epidemice sunt varza, laptele, brânzeturile, puii, curcanii, laptele, pateul, limba de porc, ciupercile etc.

Cea mai gravă formă de listerioză este însă cea materno-fetală, nu atât pentru mamă, cât pentru făt sau nou-născut. Acesta poate face o formă precoce de infecție (la 3-4 zile de la naștere, mai ales la prematuri), care se manifestă sub forma unei septicemii generalizate cu cca 40-50% cazuri mortale, fie sub forma unui sindrom tardiv (la 7-15 zile de la naștere), caracterizat printr-un sindrom meningeal, manifestări digestive și rareori conjunctivită. Alte forme clinice semnalate la adulți și copilul mare (în special la cei cu imunodepresie: leucemii, infecții cu virus HIV) sunt reprezentate de meningite, encefalite, sau chiar septicemii, cu o rată mare a mortalității, sau cu sechele neurologice printre supraviețuitori. Au mai fost raportate listerioze cutanate primare, artrite, osteomielite, abcese intraabdominale, peritonite, infecții pulmonare în special la veterinari și lucrătorii din abatoare (luând caracter de boală profesională), care au venit în contact cu țesuturile infectate ale animalelor bolnave.

Diagnosticul de laborator este bacteriologic. Cel serologic poate avea valoare în context epidemiologic.

**Recoltarea produselor patologice.** Produsele patologice sunt recoltate în funcție de forma și localizarea infecției: LCR, sânge, lichid amniotic, fragmente tisulare, secreții vaginale, respiratorii, probe tegumentare, probe alimentare, probe de salubritate etc., și nu necesită condiții speciale de transport. În cazul transportului prelungit produsele patologice se vor păstra la 35°C în incubator (dar nu peste 48 de ore), iar pentru testări care depășesc 48 de ore, produsele patologice se vor păstra la frigider (la 4°C) sau congelator (la -20°C), în scopul prevenirii contaminării cu alte microorganisme.

**Examenul microscopic.** Examenul direct al produselor patologice (sedimente din LCR, lichid amniotic) poate crea confuzii, deoarece pune problema diagnosticului diferențial cu streptococii, corynebacteriile, sau prin decolorare excesivă cu *H. influenzae*. De aceea confirmarea prin însămânțări pe medii de cultură este obligatorie.

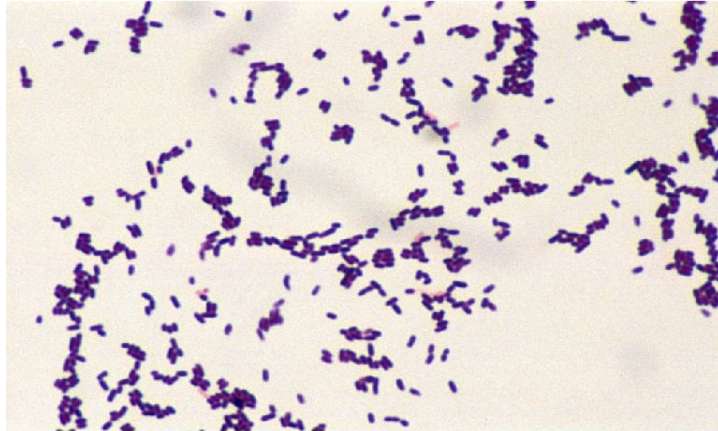


Figura 19: *Listeria* sp.- Examen microscopic Gram

**Izolarea.** Produsele recoltate din sedii în mod normal sterile (LCR, sânge, fragmente tisulare) nu necesită însămânțarea pe medii selective, inocularea primară putându-se face pe geloză-sânge (cu sânge uman, de berbec sau cal), direct sau după prealabila îmbogățire pe medii lichide de tipul bulionului cu infuzie de cord-creier, tioglicolatului etc. După o incubare de 5-7 zile la 35°C (timp în care examinarea se face zilnic), se fac repicări, din bulioanele tulburi, pe geloză-sânge (*L. monocytogenes* crește în 1-2 zile).

Produsele patologice provenite din sedii nesterile (meconiu, materii fecale, secreții vaginale, secreții respiratorii, probe tegumentare, exudate, probe alimentare, sau de salubritate) necesită însămânțarea prealabilă pe medii de îmbogățire, urmată de însămânțarea obligatorie pe medii selective cum sunt agarul LPM (litium chloride-feniletanol-moxalactam), agar Oxford, agar Oxford modificat, PALCAM-agar (polimixin-acriflavin-litium chloride-ceftazidime-esculin-manitol-agar) etc.

**Identificarea.** *Caractere morfologice.* Microscopia prin contrast de fază evidențiază bacili scurți, cu o mobilitate caracteristică, prezentând mișcări de rotație, mișcări “în piruetă”, mai pronunțate la 25°C. Frotiurile colorate Gram din cultura lichidă de 16-24 de ore evidențiază bacili gram pozitivi, în culturile mai vechi fiind gram variabile.

*Caractere culturale.* Pe geloză-sânge coloniile de listeria sunt mici, de 1 mm diametru, sau chiar mai mici, rotunde, netede, translucide, cele de *L. monocytogenes* fiind înconjurate de o zonă discretă de hemoliză, deseori vizibilă doar după desprinderea coloniei. Hemoliza poate fi pusă în evidență prin inocularea în geloză-sânge a unei colonii desprinse cu un ac de pe mediu, cu incubare 48 de ore la 35°C. Doar cele trei specii menționate (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*) sunt beta hemolitice. Primele două prezintă o zonă discretă de hemoliză bine delimitată, iar cea de-a treia o zonă largă.

Pe mediul LPM, sau pe alte medii selective fără sânge, coloniile cresc în 1-2 zile, iar examinarea trebuie făcută la microscop prin transiluminare oblică și oglindă concavă poziționată la un unghi de 45°(tehnica Henry). Listeriile apar de culoare albastră (coloniile mici, tinere) spre alb (cele mature, mari), în timp ce coloniile non-listeria apar în general de culoare portocalie.

Pe mediile Oxford, coloniile de listeria apar negre cu halou negru după o incubare de 24-48 de ore la 35-37°C (datorită hidrolizei esculinei și formării compușilor de fier de culoare neagră). Pe mediile PALCAM coloniile sunt de culoare gri-verzui, cu halou negru.

**Caractere biochimice.** Un test util cu rol în diferențierea speciilor de listeria este testul CAMP. Pe o placă cu geloză-sânge se însămânțează în striuri paralele două tulpini microbiene de *S.aureus* și *Rhodococcus equi*, iar perpendicular pe direcția de însămânțare a celor două tulpini se însămânțează tulpinile de *Listeria* de diferite specii. Plăcile se incubează 24-48 de ore la 35°C, iar apoi se examinează. Doar în cazul *L. monocytogenes*, la confluența sa cu cea de *S.aureus* va apare o zonă exacerbată de hemoliză, comparativ cu celelalte specii nevirulente la care acest fenomen nu se constată (aceleși fenomen fiind observat și în cazul *L. ivanovii* la confluența cu tulpina de *R. equi*).

Protocolul rapid de identificare presupune:

1. caracterul morfologic de cocobacili Gram pozitivi,
2. caracterul catalazo-pozitiv,
3. creșterea de tip “umbrelă” sau “brad cu vârful în jos” pe mediile semisolid, la 25-30°C,
4. beta hemoliza pe geloză-sânge de berbec,
5. testul CAMP pozitiv pentru *L. monocytogenes* (pe placă cu *S.aureus*),
6. hidroliza esculinei,
7. producere de acid prin fermentarea ramnozei și xilozei.

**Diagnosticul serologic:** Reacția de fixare a complementului poate demonstra prezenta unei infecții active cu *Listeria monocytogenes*, atunci când interpretarea se face în context clinic, iar monitorizarea anticorpilor totali se face în dinamică.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Listeriile sunt sensibile *in vitro* la penicilină, ampicilină, gentamicină, eritomicină, tetraciclină, rifampicină, cloramfenicol. S-a constatat însă că numeroase din aceste antibiotice au doar efect bacteriostatic, de aceea se preferă asociația penicilină sau ampicilină în asociere cu aminoglicozide (experimental s-a constatat o amplificare a activității antimicrobiene a penicilinei în infecții cu *L. monocytogenes*). Cefalosporinele s-au dovedit a fi ineficiente în aceste infecții.

### 4.3. GENUL *Bacillus*

Genul *Bacillus* face parte din Familia *Bacilaceae* și cuprinde bacili mari până la 10 μm, gram pozitivi, sporulați, aerobi, majoritatea mobili, catalazo-pozitivi, dispuși frecvent în lanțuri, cu capete tăiate drept. Sunt foarte răspândiți în natură, mai ales în sol, praf, ape și pe materiale de origine animală și vegetală.

**Semnificația clinică.** Singura specie înalt patogenă a genului este *B. anthracis* (bacilul cărbunos), agentul infecției cărbunoase (antraxul), dar și alte specii au fost izolate din ce în ce mai frecvent în infecții umane. *B. cereus* este agentul etiologic al unor toxiinfecții alimentare care îmbracă două forme: cu diaree, caracterizată prin dureri abdominale și care debutează la 8-15 ore de la ingestia alimentului infectat și forma emetică, ce debutează la 1-5 ore de la consum. *B. subtilis* și mai rar *B. licheniformis* au fost și ei izolați în toxiinfecții alimentare, infecții de plaga sau alte infecții nosocomiale.

Multe din speciile genului au importanță practică, cum este, de pildă *B. stearothermophilus*, specie termofilă utilizată la verificarea sterilizării. Alte specii ale acestui gen sunt producătoare de antibiotice ca, de pildă, *B. subtilis* și *B. licheniformis* (producătoare de bacitracină), *B. polymyxa* (producătoare de polimixină etc.).

### ***Bacillus anthracis***

Infecția cărbunoasă (anthrax) este o antropozoonoză cunoscută din cele mai vechi timpuri, deoarece decima cornutele și caii, animale de la care se infecta omul. După introducerea vaccinării anticărbunoase de către Pasteur în secolul trecut, incidența bolii a scăzut dar, din cauza că bacilul cărbunos este sporulat, infecția nu poate fi eradicată. Infecția umană netratată are o mortalitate relativ mare prin septicemie. În funcție de localizare anthraxul poate fi:

- **anthrax cutanat** - determinat de pătrunderea în organism a sporilor prin soluții de continuitate ale tegumentului și se manifestă sub formă de pustulă malignă și edem malign;
- **anthrax pulmonar** - care apare la tăbăcari sau la persoane ce se ocupă cu prelucrarea pieilor, prin inhalarea sporilor și care evoluează ca o pneumonie foarte gravă;
- **anthraxul digestiv** - ce se produce după consumul de carne insuficient tratată termic, provenită de la animale bolnave.

Toate formele pot evolua spre generalizarea procesului infecțios - septicemia cărbunoasă. Diagnosticul este bacteriologic.

**Recoltarea.** În cărbunele cutanat se recoltează serozitatea din vezicule cu 2 tamponae. Dacă s-a format o crustă, trebuie mobilizată și recoltată serozitatea de sub crustă cu un tub capilar. Un tampon se utilizează pentru cultură, iar din celălalt se efectuează frotiuri colorate Gram. În infecția pulmonară se recoltează spută, în toxiinfecția alimentară materii fecale și în septicemii sânge.

În cazul în care se recoltează țesuturi infectate sau sânge de la animale moarte suspecte de infecție cărbunoasă, trebuie luate toate măsurile de protecție, dat fiind faptul că bacilul cărbunos sporulează și diseminarea sporilor poate constitui oricând o sursă de infecție. S-a stabilit, de exemplu, că spori de bacil cărbunos nu își pierd viabilitatea pe frotiurile colorate Gram. Materialele infecțioase rezultate în urma diagnosticului se vor autoclava imediat.

**Examenul direct.** *Examenul microscopic* are valoare în infecția cutanată și pulmonară. Aici se vor vedea pe lângă celule, bacili gram pozitivi dispuși în lanțuri scurte, capsulați. Sunt bacili foarte mari, Gram pozitivi, având dimensiunile de 8 - 10  $\mu\text{m}$  (lungime) și 0,4 - 2  $\mu\text{m}$  (grosime). Au capetele tăiate drept. Sunt dispuși în lanțuri scurte în produsele patologice și foarte lungi în cultură. Sunt înconjurați de o capsulă comună pentru tot lanțul, *in vivo*. În condiții nefavorabile de mediu sporulează. Sporul este dispus central, de dimensiuni mai mici decât dimensiunile bacilului și apare necolorat.

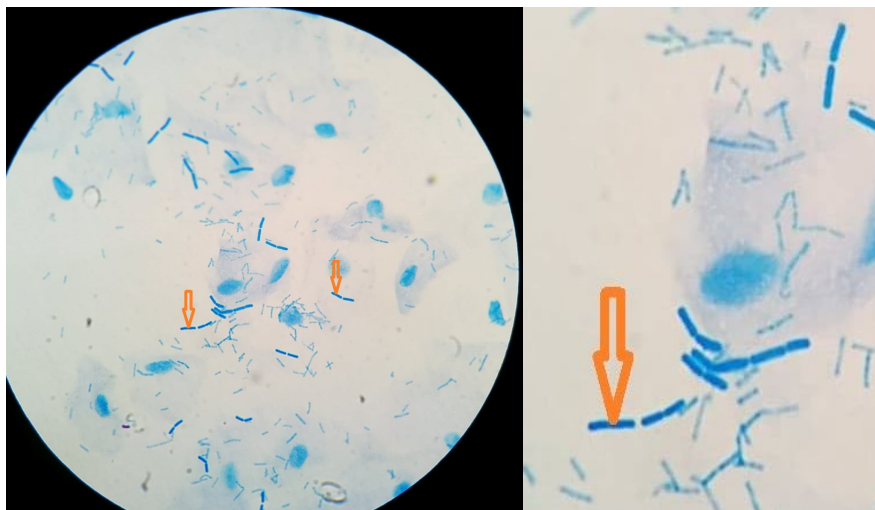


Figura 20: *Bacillus* sp. - Examen microscopic din produs biologic- frotiu colorat cu albastru de metil

**Izolarea.** *B. anthracis* nu este un germen pretențios, astfel că produsele patologice normale sterile, sau puțin contaminate, cum sunt serozitatea din leziunile cutanate nesuprainfectate și sputa, se pot însămânța pe geloză-sânge sau chiar geloză simplă. Pe geloză simplă bacilul cărbunos produce colonii de tip R, cu marginile neregulate, care privite la lupă sunt comparate cu o „barbă de călugăr”, „coama de leu” sau cu un „cap de meduza”. Acest caracter are valoare descriptivă dar nu de diagnostic.

Dacă însă produsele provin din zone contaminate și cu altă floră ca, de pildă, materiile fecale, alimente contaminate, carcase ale animalelor suspecte de a fi murit din cauza infecției cărbunoase, ele trebuie tratate diferit. Întrucât în aceste produse, baciliile cărbunoși vor fi prezenți mai ales sub formă de spori, ele se vor suspenda în apă bidistilată la 62,5°C timp de 15 minute, timp în care toate formele vegetative vor fi distruse. Însămânțarea se face pe geloză-sânge sau medii selective ca, de pildă, mediul PLET (polimixină, lizozim, EDTA, acetat de talium). Pe geloză-sânge se dezvoltă colonii gri-albicioase de 1-3 mm cu margini neregulate.

Izolarea din produsele recoltate a altor specii de *Bacillus* nu este un motiv de implicare etiologică, cu excepția *B. cereus*, dacă este izolat din materiile fecale la 3 zile după episodul de toxiinfecție alimentară.

Pe mediul PLET, bacilul cărbunos este greu de diferențiat de *B. cereus* în toxiinfecții alimentare. Din acest motiv se utilizează și medii selective pentru *B. cereus*. Un astfel de mediu este mediul BCM.



Figura 21: *Bacillus cereus* – cultură pe mediul solid geloză-sânge

**Identificarea.** Identificarea bacilului cărbunos nu este dificilă în contextul clinic și anamnetic corespunzător. Capsula bacilului cărbunos poate fi demonstrată fie, *in vitro*, prin însămânțarea direct în sânge de cal sau pe agar ce conține 0,7% bicarbonat de sodiu și incubat în atmosferă de bioxid de carbon. Confirmarea se face *in vivo* prin boală experimentală la șoarecele de laborator, care va face o septicemie cărbunoasă în 48 de ore. Pe amprente de splină se vor observa baciliile gram pozitive, în lanțuri scurte cu capsulă comună.

Alte specii ale genului *Bacillus* sunt identificate pe baza testelor biochimice, sistem API, carduri Vitek (Biomeriux) sau pe sistem Malditof.

Diagnosticul se mai poate pune prin **boala experimentală la șoarecele alb**. Dacă în produsul patologic recoltat există bacili cărbunoși, atunci șoarecele face în 24 ore o septicemie mortală.

**Diagnosticul retrospectiv al antraxului** se face prin reacția Ascoli. Principiul reacției Ascoli este următorul: se realizează filtratul de Ag (din organe de cadavru) care va participa la o reacție de precipitare cu Ac cunoscuți.

**Sensibilitatea la antibiotice.** *B. anthracis* este sensibil la penicilină, gentamicină, eritromicină, cloramfenicol, tetraciclină, ciprofloxacina și rezistent la cefuroxim. *B. cereus*, însă, produce o beta-lactamază care îi conferă rezistență la peniciline și unele cefalosporine. Și-a păstrat sensibilitatea la clindamicină, vancomicină, aminoglicozide, tetraciclină, dar este rezistent la trimetoprim.

## 5. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

Familia *Enterobacteriaceae* reprezintă cea mai vastă unitate taxonomică, care include 44 genuri, dintre care 25 au fost implicate în patologia umană.

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

Enterobacteriile sunt germeni aerobi, facultativ anaerobi, nepretențioși nutritiv.

**Semnificația clinică.** Enterobacteriile sunt germeni ubicuitari - se izolează din sol, apă, plante, intestinul omului și animalelor. Majoritatea (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* etc.) fac parte din flora normală a organismului și pot produce infecții oportuniste. Unele specii, ca de pildă *Salmonella typhi*, *Shigella* spp. - au habitat exclusiv uman găsindu-se numai la bolnav sau la purtătorul sănătos.

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

Enterobacteriile sunt germeni responsabili de producerea a numeroase **infecții intestinale și extraintestinale**, sau mai rar, pot apare **infecții generalizate** pe un fond de rezistență scăzută a organismului.

Reprezintă 80% din totalitatea bacililor gram negativi izolați și peste 50% din totalul germeilor izolați. De asemenea, sunt implicate în etiologia a 30-35% din septicemii, în peste 70% din infecțiile urinare și în majoritatea toxiiinfecțiilor alimentare. Sunt cauză frecventă a infecțiilor nosocomiale – infecții asociate asistenței medicale.

Germenii care produc infecțiile extraintestinale sunt *E. coli*, unele specii de *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* și *Serratia*. Patogenii enterici sunt *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Yersinia*, mai rar *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* și *Serratia*, implicația acestora din urmă în infecțiile intestinale fiind discutabilă.

Sursa de germeni este reprezentată de un rezervor animal (infecțiile cu *Salmonella*), un purtător uman (*Shigella*, *Salmonella Typhi*) sau flora oportunistă a organismului (*E. coli* etc.).

**Recoltarea.** *Recoltarea probelor în infecțiile extraintestinale* depinde de localizarea infecției și a fost descrisă în capitolul respectiv (a se vedea recoltarea sângelui, urinei, secrețiilor purulente, etc.). Enterobacteriile se înmulțesc foarte repede în produsele patologice ca, de pildă în urină, motiv pentru care trebuie trimise cât mai repede la laborator, unde vor fi păstrate la frigider până la prelucrare.

În *infecțiile intestinale* se recoltează materii fecale. Acestea trebuie recoltate cât mai aproape de debutul infecției, preferabil din scaunele spontane. Ele se însămânțează la cel mult 2 ore după recoltare. Dacă nu este posibil, sunt necesare medii de transport de tipul Cary-Blair, Stuart sau Amies.

**Examenul direct al materiilor fecale.** Examenul macroscopic este important, deoarece materiile fecale purulente și muco-sanguinolente orientează diagnosticul spre o infecție cu

*Shigella* (dizenterie). *Examenul direct microscopic* nu intră în rutina laboratoarelor. Totuși se poate efectua un preparat colorat cu albastru de metilen pentru evidențierea leucocitelor.

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

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

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

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

În practica curentă a laboratoarelor se utilizează un mediu de îmbogățire (preferabil bulion cu selenit acid de sodiu), și minim două medii selective cu potențial selectiv diferit, preferabil agarul MacConkey asociat cu ADCL, agar SS sau agar XLD.

După însămânțare, mediile se incubează la termostat la 35-37°C, timp de 18-20 de ore.

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

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

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

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

- *geloză TSI*-pe care se testează fermentarea glucozei, lactozei, precum și producerea de H<sub>2</sub>S și gaz.
- *mediul MIU* pentru cercetarea mobilității, prezenței indolului și ureazei.
- *reacția roșu metil (RM)*
- *utilizarea citratului de sodiu ca sursă unică de carbon*
- *testul fenilalanindezaminazei (FAD)* –pozitivă la tulpinile de *Proteus / Providencia / Morganella* spp.



Pentru unele specii identificarea de gen nu este suficientă, deoarece cuprind mai multe serotipuri (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogen). **Identificarea serologică pe baza structurii antigenice** constă în evidențierea unei structuri antigenice și/sau grupări de structuri antigenice, prin reacții antigen-anticorp (aglutinare, coaglutinare, latex-aglutinare). Studiul antigenic bazat pe determinarea antigenelor somatice O, capsulare K și flagelare H permite încadrarea bacteriilor aparținând unui gen în specii sau serotipuri.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Determinarea sensibilității la antibiotice este obligatorie, deoarece enterobacteriile au dobândit, relativ repede, rezistență la o serie de antibiotice, cel mai frecvent prin transfer de plasmide. Dacă nu este posibilă antibiograma, medicul care prescrie antibioticul trebuie să cunoască rezistența naturală, genetică a enterobacteriilor și să fie orientat asupra rezistenței dobândite la tulpinile circulante în acea zonă. Testarea sensibilitatii la antibiotice se poate face fie difuzimetric, fie prin utilizarea de sisteme automate (Vitek, Sensititre, MicroScan, etc.) cu posibilitatea determinării CMI. Pe măsura unor noi descoperiri și a sporirii cerințelor epidemiologice și de diagnostic, au fost dezvoltate scheme de tipizare bacteriofagică (lizotipie), bacteriocinică (bacteriocinotipie) și ulterior antibiotică (antibiotipie). De asemenea, dezvoltarea tehnicilor moleculare au dus la introducerea tipizării genetice ca practică concomitentă sau alternativă la tipizarea fenotipică sau în vederea evidențierii genelor de existență la antibiotice.

## 5.1. Genul *Salmonella*

Genul *Salmonella* conține peste 1500 de serotipuri a căror clasificare este în continuă modificare și completare. Ele aparțin unei singure specii *Salmonella enterica*, care este împărțită în 7 subgrupe: *Salmonella choleraesuis*(1), *Salmonella salame*(2), *Arizona arizonae*(3a), *Arizona diarizone*(3b), *Salmonella houtenae*(4), *Salmonella bongori*(5) și *Salmonella indica*(6). În rutină se desemnează ca specii serotipurile.

Majoritatea salmonelelor patogene pentru om se află în subgrupa 1 (dar câteva se află și în subgrupele 3a și 3b).

Toate serotipurile de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sunt parazite pentru om și mamifere, în timp ce celelalte subspecii și *Salmonella bongori* se întâlnesc preponderent la păsări și animale cu sânge rece.

Cele două surse majore, omul și animalele, sunt responsabile de poluarea solului și a apelor, în care pot supraviețui mult timp. Există serotipuri de *Salmonella* cu specificitate de gazdă, prezente numai la om (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*), la animale (*S. Typhisuis* – la porci, *S. Abortus ovis* – la oi) sau păsări (*S. Gallinarum*, *S. Pullorum*).

Tabel 4: Clasificarea salmonelelor: Schema Kaufmann-White

Grupul	Specia
A	<i>S. paratyphi A</i>
B	<i>S. paratyphi B</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. heidelberg</i> <i>S. agona</i> <i>S. derby</i>
C	<i>S. paratyphi C</i> <i>S. concord</i> <i>S. thompson</i> <i>S. bovismorbificans</i> <i>S. newport</i>
D	<i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i>
E	<i>S. anatum</i> <i>S. london</i>

**Semnificația clinică.** Salmonelele sunt germeni înalt-patogeni. Izolarea lor de la gazda umană are întotdeauna semnificație clinică: bolnav sau purtător sănătos.

Poarta de intrare digestivă (epiteliul intestinului subțire) este comună pentru toate speciile. Toate speciile, aparent, pot supraviețui acidității gastrice și pot penetra epiteliul și subepiteliul intestinal, dar numai *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* și *C* sunt sistemic invazive.

Din punct de vedere al patogenității, unele salmonele produc toxiinfecții alimentare, fără să depășească bariera intestinală, pe când altele, infecții grave sistemice (febre enterice). Se descriu, de asemenea, destul de frecvent septicemii cu diverse serotipuri de salmonele, mai ales la copii.

Febrele enterice sunt infecții sistemice (septicemice) cu evoluție ciclică, caracterizate prin stare tifică, febră în platou, erupție tegumentară cu macule lenticulare, semne de suferință intestinală precum și hepato-splenomegalie. Calea de transmitere este fecal-orală.

Prototipul febrei enterice este produs de *Salmonella typhi* și poartă numele de *febră tifoidă*. Febrele enterice, care poartă denumirea de *febre paratifoide*, sunt produse de *S. Paratyphi A*, *S. Schottmuelleri* (cunoscut sub denumirea de *S. Paratyphi B*), precum și de *S. Hirschfeldii* (cunoscut sub denumirea de *S. Paratyphi C*) și au o evoluție mai blândă decât febra tifoidă. Diagnosticul diferențial se face pe baza examenelor de laborator.

Purtătorii cronici asimptomatici reprezintă 1-5% dintre pacienții cu febră tifoidă sau paratifoidă (sub 1% pentru celelalte grupe de pacienți). Germenii se găsesc la nivelul vezicii biliare și sunt excretați continuu sau intermitent prin materiile fecale. Portajul poate fi întrerupt prin antibioterapie sau colecistectomie.

**Diagnosticul de laborator în febrele enterice este bacteriologic și serologic.**

**Diagnosticul bacteriologic**

**Recoltarea și izolarea.** Alegerea produselor patologice se face în funcție de cazul în speță: bolnav sau purtător sănătos și în funcție de perioada de evoluție a bolii. La pacienții suspecți de febră tifoidă sau febre paratifoide, produsele patologice care se examinează în vederea acestui diagnostic sunt diverse. Astfel:

- sângele, pentru hemocultură poate fi recoltat în orice stadiu al bolii. Hemoculturi pozitive se obțin în 75% din cazuri în prima săptămână de boală, procentul scăzând la 50-75% în săptămâna a doua, și respectiv, până la 25% în cea de-a patra săptămână;

- măduva osoasă din măduva sternală, pentru medulocultură care este utilă în perioadele tardive ale bolii, când bacili se pot localiza aici. Rezultatele sunt mai bune decât în cazul hemoculturii, dar pacienții acceptă mai greu puncția medulară;

- materiile fecale, pentru coprocultură, care este pozitivă în 25% din cazuri la sfârșitul primei săptămâni de boală crescând progresiv la 75% în săptămâna a treia de boală;

- urina, pentru urocultură, care este pozitivă la un procent scăzut de bolnavi și urmează aceeași curbă ca și coprocultura;

- în cazurile letale se recoltează sânge din inimă, fragmente de organe (ficat, splină, ganglioni mezenterici, măduva oaselor), conținut intestinal, bilă, urină.

De la purtători sănătoși se recoltează repetat materii fecale și bilă din care se urmărește izolarea salmonelelor.

**Hemocultura** se efectuează după tehnica prezentată la partea generală, cu anumite particularități, și anume:

- se vor recolta 5-10 ml sânge în prima săptămână de boală, iar în perioadele tardive se recoltează o cantitate mai mare (cca 25-30 ml), germeii fiind mai rari în circulație, însămânțate direct în cele 2 flacoane de hemocultura (aerob /anaerob), se incubează la 37°C, timp de până la 2-3 săptămâni, până la pozitivare (semnalizata sonor de către sistemul automat).

Din flaconul pozitiv se efectuează subculturi pe geloză, fiind apoi identificate pe baza caracterelor morfologice, biochimice și antigenice. Identificarea pe baza structurii antigenice se face prin reacții de aglutinare pe lamă cu seruri anti-O și anti-H pe baza schemei lui Kauffman-White.

**Coprocultura** se efectuează atât la bolnavii de febră tifoidă, cât și la purtătorii de bacili tifici. *La bolnavi* recoltarea materiilor se face numai din scaunul emis spontan, evitându-se folosirea purgativelor (deși în stadiile inițiale febra tifoidă poate evolua cu constipație), deoarece există pericolul perforației intestinale. *La purtători* sănătoși, recoltarea se face după administrarea unei doze unice de purgativ (sulfat de sodiu și sulfat de magneziu în părți egale a 15 g dizolvate în 250 ml apă caldă). Prelevarea se face din al doilea și din al treilea scaun. Se recomandă utilizarea a 4-5 g din partea lichidă din scaun (deoarece acesta conține flora intestinului subțire) care se va introduce într-un coprorecoltor steril de unică folosință. Dacă însămânțarea nu se face în maximum 2 ore de la recoltare (pentru a nu permite multiplicarea excesivă a florei de asociație, care are un efect inhibitor asupra dezvoltării salmonelelor), este necesară utilizarea unui mediu de conservare și transport (mediul solid Cary-Blair).

Înainte de izolare pe medii solide, este obligatorie folosirea mediilor de îmbogățire lichide ce au rolul de a favoriza înmulțirea salmonelelor și de a inhiba flora de asociație. Se recomandă utilizarea a minimum două medii de îmbogățire ca, de pildă, mediul Leifson lichid (bulion cu selenit acid de sodiu) și mediul Muller-Kauffmann (bulion cu tetratrat și bilă). Acestea se incubează la 37°C timp de 18-24 ore.

De pe mediile de îmbogățire se fac treceri pe medii selective solide, care conțin o bază nutritivă, un sistem indicator (format din unu sau mai multe zaharuri și un indicator de pH) și un sistem selectiv (cu capacitate inhibitorie).

- mediu puternic selectiv este mediul Wilson- Blair (nu conține sistem indicator cu zaharuri; sistem selectiv = verde brillant);

- medii moderat selective:

- › mediul ADCL (Leifson) (agar, dezoxicolat, citrat, lactoză, sistemul indicator fiind format din lactoză și roșu neutru);
- › mediul Istrati-Meitert (sistem indicator - lactoză și albastru de bromthymol; sistem selectiv - bilă integrală titrată biologic);
- medii slab selective:
  - › mediul MacConkey (sistem indicator - lactoză și roșu neutru; sistem selectiv - săruri biliare integrale și cristal violet).

**Bilicultura** poate fi recomandată în depistarea stării de purtător de *Salmonella typhi*, în cazurile în care coprocultura și, mai ales, urocultura sunt în mod repetat negative, dar la care există suspiciunea clinică sau epidemiologică de a fi purtători.

Se recoltează 10-20 ml de bilă B, prin tubaj duodenal, după administrarea a 100 ml soluție de sulfat de sodiu 30%, se centrifughează 30 de minute la 3000 de turații pe minut iar sedimentul este însămânțat pe medii de îmbogățire și selective ca și în cazul coproculturii.

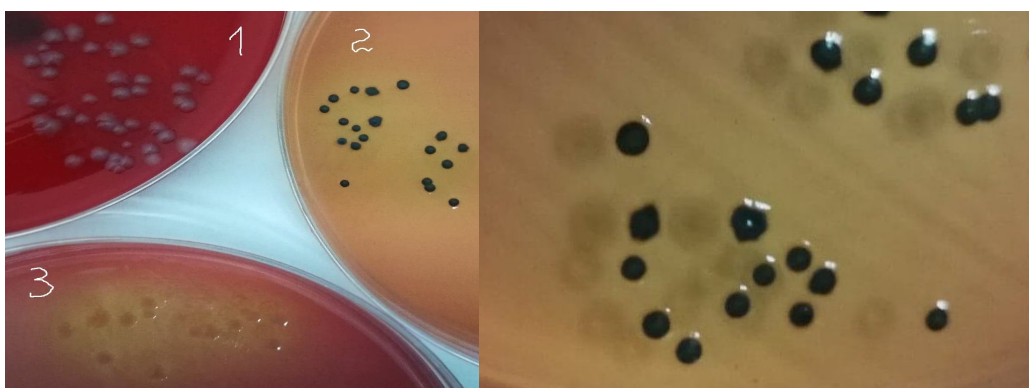


Figura 22: *Salmonella* sp.-cultură pe (1) geloză-sânge, (2) SS, (3) MacConkey

**Identificarea germenilor izolați din produsele patologice.** Coloniile izolate pe mediile selective, obținute prin coprocultură și cele obținute pe geloză înclinată sau geloză-sânge, prin hemocultură, vor fi identificate pe baza caracterelor morfologice, culturale, biochimice și antigenice.

*Caractere morfologice.* Din coloniile suspecte se efectuează un frotiu colorat Gram pe care se evidențiază bacili gram-negativi, cu dimensiuni de 2-3  $\mu\text{m}$ , cu dispoziție necaracteristică.

*Caractere culturale:*

- pe geloză simplă sau sânge (pe care s-au repicat germenii izolați prin hemocultură în bulion), salmonele produc colonii de 1-2 mm incolore, transparente;
- pe mediul Wilson-Blair (după incubare de 48 de ore la 37°C), *Salmonella typhi* dezvoltă colonii plate, cu diametrul de 1-2 mm, de culoare neagră, prezentând un halou cu luciu metalic, datorită reducerii citratului de bismut amoniacal în sulfură de bismut; uneori pot apărea și colonii mici, pulverulente, de culoare verde-închis albastrui;
- pe mediul SS (incubare de 24-48 de ore la 37°C), salmonele dau colonii fine, semitransparente, cu centrul de culoare neagră deoarece produc  $\text{H}_2\text{S}$ ;
- pe mediul ADCL (Leifson) - (incubare 24-48 de ore la 37°C), *Salmonella typhi* dezvoltă colonii transparente de culoare roz-gălbui (culoarea mediului, nu fermentează lactoză), cu centrul de culoare neagră datorită producerii de hidrogen sulfurat ( $\text{H}_2\text{S}$ );

- pe mediul Istrati-Meitert salmonelele (după o incubare de 24-48 de ore la 37°C) produc colonii transparente de culoare verde (culoarea mediului, germeni lactozo-negativi), cu centrul de culoare neagră datorită producerii de hidrogen sulfurat (H<sub>2</sub>S);
- pe mediul MacConkey (incubare de 24 de ore la 37°C) se dezvoltă colonii semitransparente, necolorate, lactozo-negative.

*Caractere biochimice.* Coloniile suspecte vor fi identificate pe baza testelor biochimice, care permit încadrarea lor în genul *Salmonella*: fermentează Glucoza (G+), nu fermentează lactoza (L-), produce H<sub>2</sub>S, citrat +, etc.



Figura 23: Identificare *Salmonella* sp. – API 10S

*Identificarea pe baza structurii antigenice* (identificarea serologică) se practică oricărei tulpini de *Salmonella*, indiferent de produsul biologic din care a fost izolată, după stabilirea genului pe baza caracterelor biochimice.

Grupul și tipul de *Salmonella* se pot identifica pe baza structurii antigenice după schema lui Kauffman și White, fiecare specie având indicată formula antigenică bazată pe fracțiunile antigenice somatice “O” comune (care stau la baza împărțirii în grupe a salmonelelor, notate cu litere mari ale alfabetului) și pe fracțiunile antigenice flagelare “H” specifice de tip (care stau la baza împărțirii grupelor în tipuri). La *S. Syphi* și *S. Paratyphi C* se mai adaugă și antigenul de înveliș Vi.

Pentru identificarea unei tulpini se folosește tehnica aglutinării pe lamă și se procedează astfel:

1. Se face controlul aglutinării tulpinii de identificat în ser fiziologic pentru a exclude formele “R” (rough) ce aglutinează spontan.
2. Se trece apoi la aglutinarea cu seruri ce conțin anticorpi corespunzători fracțiunilor antigenice “O” ale germenilor genului *Salmonella*, serurile anti-salmonella polivalente “O” certificând apartenența la genul *Salmonella*.
3. Pentru stabilirea grupului, germeul identificat este pus, pe rând, în contact cu seruri monovalente specifice de grup “O”
4. Se efectuează aglutinarea cu seruri monovalente specifice de tip “H” de corespunzătoare speciilor genului *Salmonella* ce aparțin grupului “O”, în care s-a obținut aglutinarea pozitivă. Astfel se ajunge la identificarea **tipului** de *Salmonella*.
5. În cazurile în care, după identificarea germenului pe baza caracterelor biochimice ca aparținând genului *Salmonella*, aglutinarea cu serurile anti-O și anti-H este negativă, se efectuează aglutinarea cu ser anti-Vi (ser care conține anticorpi anti-Vi), pentru identificarea speciilor genului *Salmonella* care posedă antigen Vi de suprafață, ce maschează antigenul somatic “O” și care sunt “O” inaglutinabile. *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi C*, *Salmonella Dublin* prezintă în plus AgVi.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Antibioticul de elecție în febrele enterice este cloramfenicolul. În cazul tulpinilor rezistente la cloramfenicol se folosesc antibiotice de rezervă. Se consideră ca tratament de valoare combinația trimethoprim + sulphametoxazol (cotrimoxazol) sau fluoquinolonele (ciprofloxacina). Se recomandă efectuarea antibiogrammei pentru a putea urmări apariția tulpinilor rezistente prin transfer de plasmide. S-au semnalat, astfel, tulpini rezistente la tetracicline, cloramfenicol, ampicilină, streptomycină, sulfonamide etc. Rezistența este dobândită prin plasmide.

**Diagnosticul serologic al febrei tifoide.** Diagnosticul serologic urmărește evidențierea și titrarea anticorpilor specifici față de antigenele somatice "O", flagelare "H" și de înveliș "Vi", în serul de cercetat. Pentru evidențierea anticorpilor specifici față de antigenele somatice "O" și flagelare "H" se utilizează reacția de aglutinare Widal (analiza serică calitativă). Diagnosticul serologic se practică începând din a doua săptămână de boală, când încep să apară anticorpii specifici în serul bolnavului (anticorpii anti-H și anti-O). Titrul lor crește, atingând un maximum în săptămâna a treia de boală, și se menține ridicat în convalescență și după vindecarea clinică, pentru un timp variabil.

*Interpretarea reacției serice calitative* se face diferit la bolnavii fără și cu antecedente vaccinale.

**Diagnosticul toxiinfecțiilor alimentare** cu salmonele este numai bacteriologic, prin coprocultură, așa cum a fost prezentat mai sus.

## 5.2. Genul *Shigella*

*Genul Shigella* cuprinde bacili mici, gram-negativi, imobili (nu prezintă flageli), nesporulați, aerobi și facultativ anaerobi. Pe baza criteriilor biochimice și antigenice, grupul (genul) *Shigella* este împărțit în 4 subgrupe serologice:

- *Subgrupa A - Shigella dysenteriae* cuprinde 10 tipuri de shigelele, care sunt cele mai virulente: tipul 1 (*Sh. shigae*), tipul 2 (*Sh. schmitzi*), tipurile 3, 4, 5, 6, 7 (grupul Large-Sachs) și tipurile 8, 9, 10.
- *Subgrupa B - Shigella flexneri* cuprinde tipurile 1 (1a,1b), 2 (2a2b), 3 (3a,3b,3c,) 4 (4a,3b) 5, 6, 7 X și Y.
- *Subgrupa C - Shigella boydii* cuprinde 15 tipuri.
- *Subgrupa D - Shigella sonnei* se poate întâlni ca formă S sau R. Fermentează tardiv lactoza spre deosebire de restul shigelelor care nu fermentează acest zahăr.

**Semnificația clinică.** Sunt germeni înalt patogeni cu habitat strict uman (bolnavi sau purtători sănătoși). Denumiți și bacili dizenterici, germenii din genul *Shigella* sunt agenții etiologici ai **dizenteriei bacteriene**, fiind localizați la nivelul colonului sigmoid. Caracterile de patogenitate se manifestă prin multiplicare, invazivitate și toxinogeneză.

Contaminarea se face pe cale fecal-orală, consecutiv consumului de alimente sau apă contaminată. Muștele sunt cei mai importanți vectori. Perioada de incubație este scurtă (1-3 zile), iar debutul brusc cu febră, crampe abdominale severe, tenesme, scaune direice frecvente mucopurulente și mucosangvinolente patognomonice, însoțite de semne neurologice și fenomene generale ca febră și deshidratare. Cea mai gravă formă de dizenterie este dată de *Sh. shigae* care secretă o neurotoxină.

În zona noastră geografică îmbolnăvirile cu *Shigella* spp. sunt produse mai frecvent de *S. flexneri* și *S. sonnei*.

**Recoltare.** La bolnavii cu dizenterie acută se recoltează cu un tampon porțiunile mucopurulente și mucosanguinolente ale materiilor fecale. La bolnavii cu dizenterie cronică și la purtători se recoltează material din leziunile mucoasei colice cu o sondă Nelaton, sub control rectoscopic. Probele se introduc în mediu de transport Stuart sau Carry-Blair, deoarece bacilii dizenterici își pierd viabilitatea relativ repede.

**Izolarea.** Însămânțarea se face pe medii selective ADCL (Leifson), SS, MacConkey și XLD, pe care shigelele se diferențiază prin fermentarea xilozei.

**Identificarea. Caractere culturale.** Pe mediile de cultură, bacilii dizenterici cresc sub forma unor colonii mici (1-2 mm), rotunde, convexe, cu margini regulate, transparente, lactozo-negative (deci de culoarea mediului). Pe mediu XLD produce colonii roșii, deoarece fermentează xiloza.

**Caractere biochimice:** Coloniile lactozo-negative vor fi identificate pe baza testelor biochimice, care permit încadrarea lor în genul *Shigella*: G+, L-, H<sub>2</sub>S-, citrat-, etc.

**Structura antigenică** este reprezentată în mod special de antigenele somatice O, care stau la baza identificării serologice. Stabilirea subgrupe și a tipului se face prin reacția de aglutinare pe lamă, cu seruri polivalente și apoi cu seruri monovalente de tip. Ordinea în care se utilizează serurile depinde de frecvența tulpinilor în zona geografică respectivă. În laboratoarele noastre se utilizează ser aglutinant polivalent Flexner, ser polivalent Sonne S, ser polivalent Sonnei R, ser polivalent Boyd, Large-Sachs și Shiga după care urmează identificarea de tip.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Se remarcă o creștere a rezistenței la unele antibiotice cu spectru larg (cloramfenicol, tetraciclină, ultima fiind utilizată mai ales în tratamentele scurte - "doză șoc" în focarele de dizenterie).

### 5.3. Genul *Escherichia*

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

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

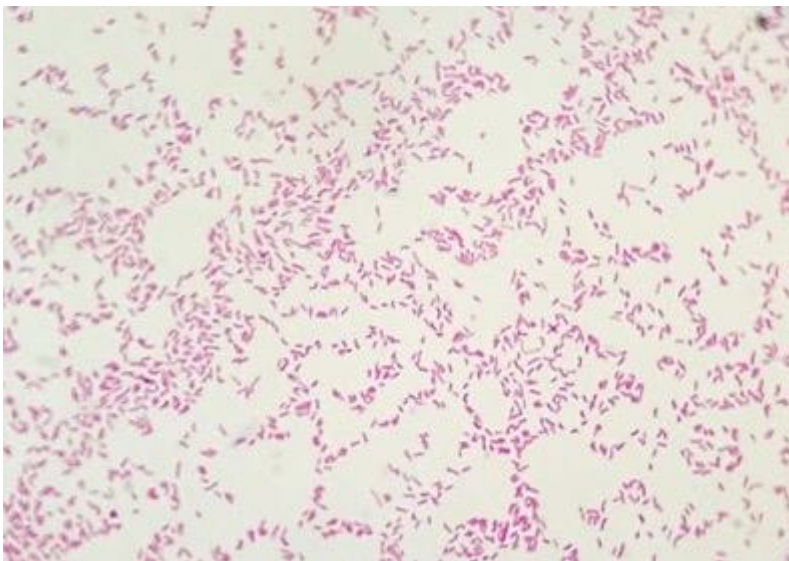


Figura 24: *E.coli*: Examen microscopic- cultură - colorație Gram

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

**a. infecții enterale**

**b. infecții extraenterale.**

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

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

Rezervorul de infecție al tulpinilor de EIEC, ETEC, EPEC este uman, iar al celor EHEC este bovin.- ***E. coli* enterotoxigen (ETEC)** – la adulți produce forme ușoare de enterită, iar la copiii din țările subdezvoltate produce un sindrom diareic holeriform.

- ***E. coli* enteroinvaziv (EIEC)** - penetrează, ca și shigellele, enterocitele colonului în care se multiplică și pe care le distrug, determinând un sindrom diareic dizenteriform, cu scaune mucopurulente sau sangvinolente.

- ***E. coli* enteropatogen (EPEC)** - este principalul agent etiologic al sindromului diareic la copii mici, la care determină o imunizare precoce. De aceea, îmbolnăvirile prin EPEC la vârste mai mari de 2 ani sunt rar semnalate.

- ***E. coli* enterohemoragic (EHEC)** - produce inițial apare o diaree apoasă, care în câteva zile devine hemoragică, iar mucoasa rectului și a colonului sigmoidian devine friabilă și sângerează. Frecvent colita hemoragică se complică cu un sindrom hemolitic uremic. Boala se declanșează predominant în sezonul cald, la copii sub 5 ani, prin consum de carne de vită insuficient preparată termic sau consum de lapte nepasteurizat. Aproximativ jumătate din EHEC aparțin serotipului O157: H7.

- ***E. coli* enteroagregativ (EAggEC)** – manifestă particularitatea de a se lega „agregativ” de enterocite.



- *E. coli* enteroadherent difuz (DAEC) – are rol diareigen controversat; aderența difuză și invazia celulară ar sta la originea sindromului diareic.

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

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

- pe mediul MacConkey, pe mediul ADCL - care au ca indicator de pH roșu neutru (roșu în mediu acid și incolor în mediu bazic), *E. coli* dă colonii rotunde, lucioase de tip S, de culoare roșie, cu un diametru de 2-3mm,

- pe mediul AABTL, pe mediul Istrati-Meiert, cu albastru bromtymol ca indicator de pH, bacilul coli dezvoltă colonii cu aceleași caractere, dar de culoare galbenă.

Este de reținut faptul că din 100 de tulpini de *E. coli*, 95 fermentează lactoza, dar 5 nu. În consecință, prezența unor colonii lactozo-pozitive nu exclude bacilul coli în contextul celorlalte teste biochimice.

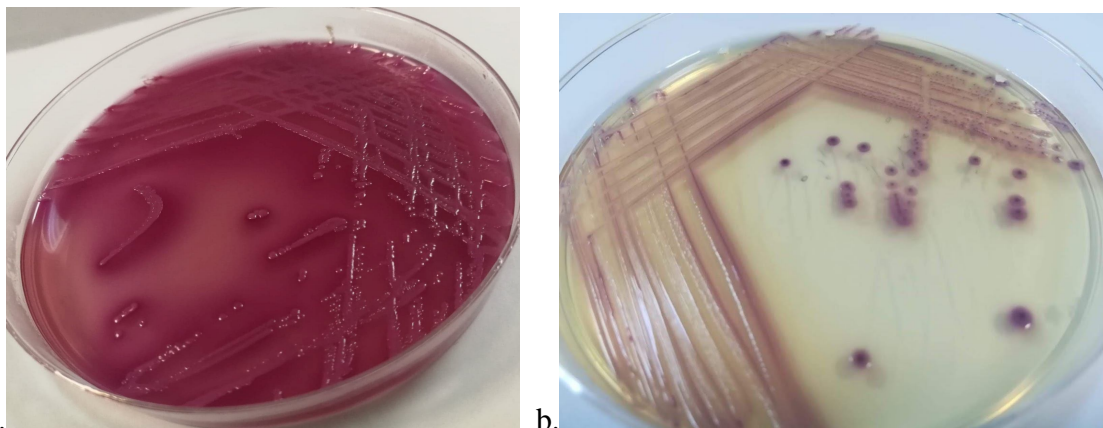


Figura 25: *E.coli* : Cultură: (a) mediul Mac Conkey (colonii lactozo-pozitive); (b) mediul diferențial-CHROMagar UTI

**Identificarea** speciei se face pe baza caracterelor biochimice : G+, L+, H2S-, citrate -, etc.

*E. coli* care aparțin grupelor cu patogenitate intestinală nu se deosebesc din punct de vedere cultural și biochimic de tulpinile care se găsesc în mod normal în flora intestinală. Studiul structurii antigenice ale acestor tulpini a arătat o corespondență între diverse serotipuri și potențialul patogen enteral.

- *Tulpinile enteropatogene de E. coli* (EPEC) se identifică numai antigenic, pe baza antigenelor O și B (fracțiune a antigenului de înveliș K) pe care îl posedă. Identificarea se efectuează prin reacții de aglutinare pe lamă. Cinci colonii lactozo-pozitive se aglutinează pe lamă cu ser polivalent anti *E. coli* enteropatogen. Dacă reacția e pozitivă, se continuă identificarea serotipului cu seruri monovalente din setul standard. - *Tulpinile enterotoxice* (ETEC), reprezentate de relativ puține serotipuri (O<sub>6</sub>H<sub>16</sub>, O<sub>8</sub>, O<sub>8</sub>H<sub>9</sub>, O<sub>11</sub>H<sub>27</sub>, O<sub>27</sub>H<sub>7</sub> etc.), secretă enterotoxine termostabile și termolabile. Cele care secretă toxine termolabile se pot identifica, deoarece există kituri comercializate.

- *Tulpinile enteroinvazive de E. coli* (EIEC) produc o infecție enterală, sub forma unei diarei apoase mucopurulente și rar sanghinolente. Se pot identifica prin PCR, Elisa.

- *Tulpinile de E. coli enterohemoragic (EHEC)* au proprietatea de a produce două toxine, diferite antigenic, care sunt citotoxice pentru celulele HeLa și Vero. Ele au fost denumite verotoxina 1 și 2. Toxiinfecția se manifestă prin diaree sanguinolentă, care se aseamănă cu diareea din dizenterie. *Tulpinile de E. coli O157H7* produc infecții intestinale caracterizate prin dureri abdominale, diaree sanguinolentă și inflamație colică. Sunt relativ ușor de identificat deoarece, spre deosebire de tulpinile de *E. coli* uzuale, fermentează tardiv sau deloc sorbitolul (pe mediul MacConkey cu sorbitol) și aglutinează serul imun O<sub>157</sub>H<sub>7</sub>.

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

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

**Urocultura cantitativă** este singura metodă care stabilește cu certitudine diagnosticul de infecție a tractului urinar. Ea face diferențierea dintre o infecție a căilor urinare și o contaminare cu germeni saprofiți, stabilind eficiența tratamentului antiinfecțios.

E.H. KASS (1956) a stabilit, prin cercetări la pacienți cu pielonefrită, ca fiind semnificativ pentru o ITU (infecție a tractului urinar) pragul de  $\geq 10^5$  UFC/ml urină (UFC = unități formatoare de colonii).

**Recoltarea.** Se recoltează într-un balon steril, jetul mijlociu al urinei de dimineață, după toaleta organelor genitale. Urina se însămânțează în maximum o oră de la recoltare, deoarece germeni se multiplică foarte rapid. În acest caz urocultura poate apare fals pozitivă. În cazul în care nu se poate transporta sau prelucra în acest interval, urina se păstrează la frigider la +4°C.

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

**Însămânțarea** se efectuează prin:

*Tehnica anșelor calibrate.* Se utilizează două anse calibrate (una cu diametrul interior de 5 mm și cealaltă de 2,5 mm) astfel încât volumul încărcat de urină omogenizată (nediluată) să reprezinte 0,01 ml, respectiv 0,001 ml. Cu anșa mică urina se însămânțează pe geloză-sânge și cu cea mare pe mediu Mac Conkey. Plăcile se incubează la termostat la 37°C până a doua zi. Numărul de germeni/ml urină se obține prin înmulțirea numărului de colonii cu 100 (respectiv 1000) și apoi se face media aritmetică.

Interpretarea rezultatelor:

- $< 10^3$  UFC/ml ( $< 1.000$  germeni/ml urină) este o bacteriurie nesemnificativă
- $10^4$  (10.000 germeni/ml urină) posibil contaminare din căile urinare inferioare, se recomandă repetarea uroculturii,
- $10^4 - 10^5$  UFC/ml (între 10.000 - 100.000 germeni/ml urină), suspiciune de ITU, rezultatul este discutabil în funcție de context și germeni identificați, urocultura se poate repeta,
- ( $\geq 10^5$  UFC/ml ( $\geq 100.000$  germeni/ml urină), infecția urinară este certă, dacă se izolează o singură specie microbiană.

NOTĂ: Pragul semnificativ pentru o ITU este pentru enterobacterii, *Pseudomonas*, enterococi, de  $10^5$  UFC/ml, pentru stafilococi de  $5 \times 10^4$  UFC/ml, iar pentru *Candida* de  $10^4$  UFC/ml. Identificarea mai multor specii microbiene presupune contaminarea probei și se indică repetarea uroculturii.

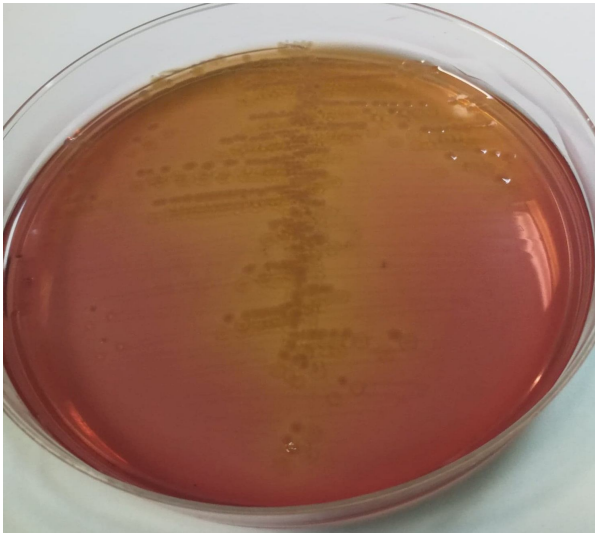


Figura 26: *E.coli* (colonii lactozo-negative): urocultură cantitativă pe mediul solid Mac Conckey- $5 \cdot 10^4$  UFC/ml

Identificarea speciei se face pe baza testelor biochimice prezentate mai sus, iar identificarea de serotip se face numai în laboratoare de referință.

În situația în care anamneza, tabloul clinic al pacientului, și examenul sedimentului urinar pledează pentru o infecție urinară cu bacil coli, iar urocultura este constant sterilă, trebuie ținut cont că tulpinile de bacili coli supuse unui tratament îndelungat cu biseptol își pierd capacitatea de a sintetiza timidină, nucleotid necesar sintezei de ADN. În acest caz urina respectivă se va însămânța pe un mediu suplimentat cu timidină și urocultura va demonstra prezența unei infecții urinare.

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

În ceea ce privește rezistența la beta-lactamine, fenotipul sensibil (sălbatic) se caracterizează printr-o relativă sensibilitate la toate beta-lactaminele. Fenotipul producător de penicilinază se caracterizează prin rezistență la amino și carboxipeniciline. Fenotipul producător de cefalosporinază presupune rezistența la asociația amoxicilină/clavulanat, precum și la cefalosporinele de generația I, II. Fenotipul producător de  $\beta$ -lactamaze cu spectru extins (BLSE) este întâlnit printre tulpinile de spital și presupune rezistența la toate beta-lactaminele, inclusiv la cefalosporinele III, IV. Deseori acest ultim fenotip asociază rezistența și la alte clase de antibiotice: fluoroquinolone, aminoglicozide, etc. Tulpinile multirezistente de tipul celor BLSE se tratează cu antibiotice de rezervă, de tipul carbapenemelor (imipenem, meropenem), sau colistinului.

Pentru sceningul pacienților colonizați cu tulpini BLSE se pot folosi medii selective cromogene de tip BLSE agar, iar pentru tulpinile secretoare de carbapenemaze, CRE agar.

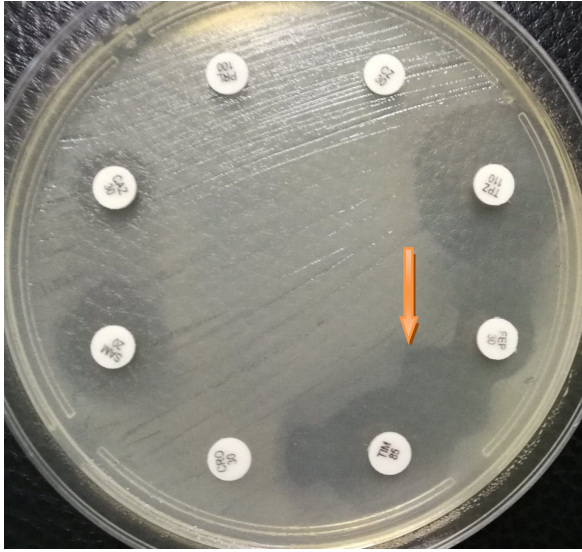


Figura 27: *E.coli* fenotip BLSE-antibiogramă difuzimetrică

#### 5.4 Genul *Klebsiella*

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

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

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

*K. pneumoniae* este specia cel mai frecvent izolată din cadrul genului. În cazul scăderii rezistenței antiinfecțioase a organismului (la prematuri și la vârstnici), *Klebsiella* poate cauza infecții grave - pneumonii, septicemii și meningite. Este agentul etiologic important al unor infecții nosocomiale (suprainfecția plăgilor chirurgicale, infecții urinare, septicemii). Au fost raportate epidemii nosocomiale cu tulpini rezistente la numeroase antibiotice, mai ales în secțiile de nou-născuți. Implicația etiologică în boala diareică este discutabilă.

*K. oxytoca* produce infecții similare.

Speciile *K. rhinoscleromatis* și *K. ozenae* sunt patogene numai pentru om, la care produc rinite cronice, mai frecvente în zonele tropicale:

- *K. rhinoscleromatis* – rinoscleromul - rinită cronică hipertrofică cu leziuni granulomatoase;
- *K. ozenae* – ozena - afecțiune inflamatorie cronică cu supurații mucoase și fetide, însoțită de atrofia mucoasei nazale, ce poate duce la pierderea simțului olfactiv.

Alte specii, mai rar izolate sunt: *K. ornithinolytica* și *K. planticola*, izolate din urină, secreții respiratorii și sânge la om.

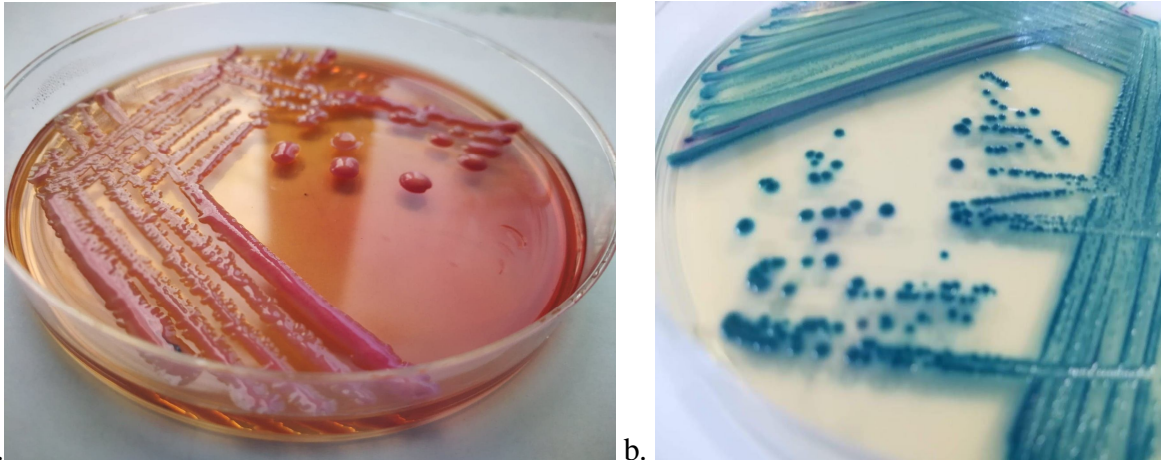
**Recoltarea** produselor este în funcție de localizarea infecției. Se recoltează secreții purulente, spută, urină, LCR, sânge, materii fecale etc.

**Examenul direct.** Din produsele normal sterile sau puțin contaminate cum este sputa, frotiul colorat Gram poate orienta spre diagnostic. Prezența PMN și a unor bacili scurți, gram

negativi, colorați bipolar, capsulați dispuși în diplo în sensul lungimii sau în lanțuri scurte, indică cu maximă probabilitate o infecție cu *Klebsiella*.

**Izolarea.** Produsele normal sterile se însămânțează pe medii simple cum este geloză-sânge. Sângele pentru hemocultură se însămânțează în bulion (flacoane Bactec/Bactalert), făcându-se replicări pe geloză-sânge din flacoanele pozitive. Materiile fecale se însămânțează pe medii selective pentru enterobacterii: MacConkey, ADCL (Leifson), XLD. Incubarea se face la 37°C timp de 24 ore.

**Identificarea. Caractere culturale.** În bulion *Klebsiella* tulbură uniform mediul, iar la suprafață se formează un vâl vâscos ce cade la fundul tubului. Pe geloză-sânge dezvoltă colonii mari, alb-cenușii, mucoase (aspect de cultură ce curge pe suprafața mediului), colonii care, prin învechire, devin cafenii. Pe mediul Istrati-Meitert se dezvoltă colonii mari, mucoide, inițial lactozo-pozitive (galbene), apoi, după 24 de ore, “lactozo-negative” (verzi), datorită fenomenul de “cameleonaj” prin alcalinizarea mediului. Pe mediul Mac Conkey dezvoltă colonii mari, roșii, lactozo-pozitive, cu apariția fenomenului de “cameleonaj”.



a. b.  
Figura 28: Cultură *Klebsiella* sp.- (a) mediul Mac Conkey, (b) mediul diferențial-CHROMagar UTI

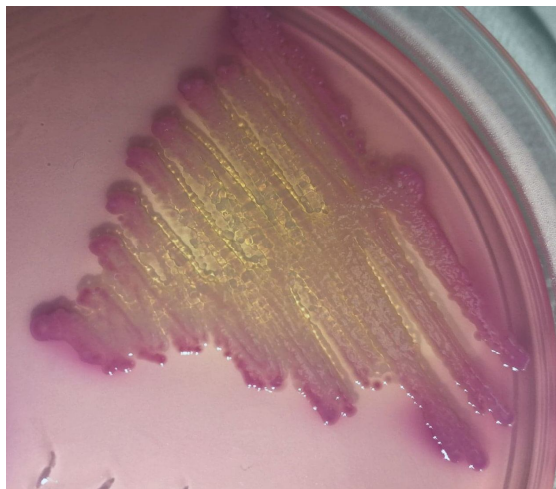


Figura 29: *Klebsiella* sp - fenomenul de cameleonaj - mediul Mac Conkey

**Caracterele biochimice.** Bacili din genul *Klebsiella* : *G+*, *L+*,  $H_2S$  -, imobili, ureaza +, indol-, etc. Scindarea malonatului de Na și creșterea pe mediul cu citrat Simmons diferențiază cele 4 specii de *Klebsiella*. *K. oxytoca* produce indol, caracter unic ce o diferențiază de *K. pneumoniae*.

**Identificarea tipului** se face pe baza structurii antigenice prin reacții de aglutinare și umflare a capsulei cu seruri anticapsulare, dar numai în laboratoare de referință.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Genul *Klebsiella* cuprinde deseori germeni cu multirezistență dobândită la antibiotice. Ei sunt, în general, rezistenți la cloramfenicol, tetraciclină, streptomycină și biseptol, fiind sensibili la gentamicină, colistin, amikacină, carbenicilină, acid nalidixic, ofloxacin și cefalosporine din generația a II-a și a III-a. Se remarcă însă o creștere a rezistenței și la aceste antibiotice, antibiograma fiind, deci, obligatorie pentru orice tulpină izolată.

În ceea ce privește existența la beta-lactamine, fenotipul sălbatic este caracterizat printr-un nivel scăzut de rezistență la amino și carboxipeniciline (activitate restaurată prin inhibitorii de beta-lactamază). Celelalte fenotipuri de rezistență sunt asemănătoare celor descrise la *E.coli*. Tulpinile de spital sunt în general multirezistente la antibiotice. Pentru screeningul pacienților colonizați cu tulpini BLSE se pot folosi medii selective cromogene de tip BLSE agar, iar pentru tulpinile secretoare de carbapenemaze, CRE agar.

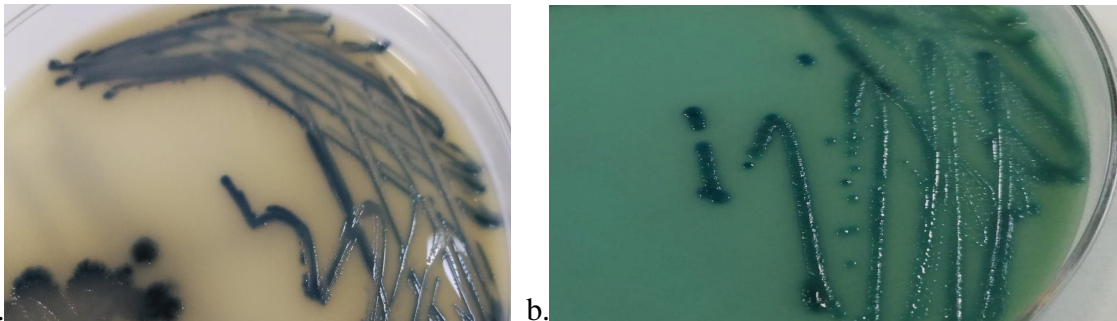


Figura 30: *Klebsiella* sp.-Test screening pozitiv pe (a) BLSE agar, (b) CRE agar

## 5.5 Genul *Proteus*

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

Germenii din genul *Proteus* sunt foarte răspândiți în natură, mai ales acolo unde există materii organice în descompunere (gunoaie, sol, ape reziduale, carne alterată etc.) deoarece participă la procesele de putrefacție.

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

Infecțiile urinare sunt cele mai frecvente afecțiuni determinate de acești germeni. Majoritatea sunt produse de specia *P. mirabilis* și mai rar de *P. vulgaris*. Deoarece produce o mare cantitate de urează ce descompune ureea în  $CO_2$  și  $NH_3$ , pH-ul urinar crește, iar

posibilitatea formării calculilor urinari coraliformi este mare. Creșterea pH-ului urinar este de asemenea, toxică pentru uroepiteliu (efect necrozant).

Germenii din genul *Proteus* produc și infecții ORL (otite medii supurate, sinuzite), infecții respiratorii, infecții ale plăgilor și arsurilor, septicemii și meningite la nou-născuți și sugari, mai rar din infecții digestive.

Pot produce infecții asociate asistenței medicale (infecții urinare, suprainfecția plăgilor arse, plăgi postoperatorii - de unde se izolează, în general, în amestec cu alți microbi).

**Recoltarea** se face în raport cu localizarea infecției (urină, materii fecale, puroi, spută, L.C.R., sânge etc).

**Examenul microscopic direct.** Are valoare orientativă și se aplică doar produselor natural sterile (LCR, de pildă). Pe frotiuri colorate Gram, se evidențiază, alături de elementele inflamatorii, bacili gram negativi cu dispoziție necaracteristică (morfologie comună enterobacteriilor), și forme filamentoase (datorită polimorfismului accentuat al genului *Proteus*).

**Izolarea și identificarea.** Mediile utilizate depind de produsul recoltat. Cele monomicrobiene se însămânțează pe medii simple, cum este geloză-sânge. Pe aceste medii, bacilul proteus este ușor de recunoscut, prin **mirosul de putrefacție** degajat, precum și prin producerea **fenomenului de invazie**. El crește sub forma unor valuri concentrice care invadează toată placa, după o noapte de incubare la termostat. Dacă se repică pe geloză înclinată, mobilitatea apare sub forma **fenomenului de cățărare**.

Produsele patologice, în care există și altă floră, se însămânțează, în mod obligatoriu, pe mediile selective, pentru a obliga bacilul proteus să crească sub forma unor colonii izolate și să nu invadeze ceilalți microbi, care astfel nu mai pot fi identificați. Se utilizează mediile selective deja descrise. Bacilul proteus crește sub forma unor **colonii** rotunde, de culoarea mediului, transparente la periferie și **negre la centru datorită H<sub>2</sub>S** pe care îl produce. Ele au fost comparate cu un **“ochi de pisică”**.

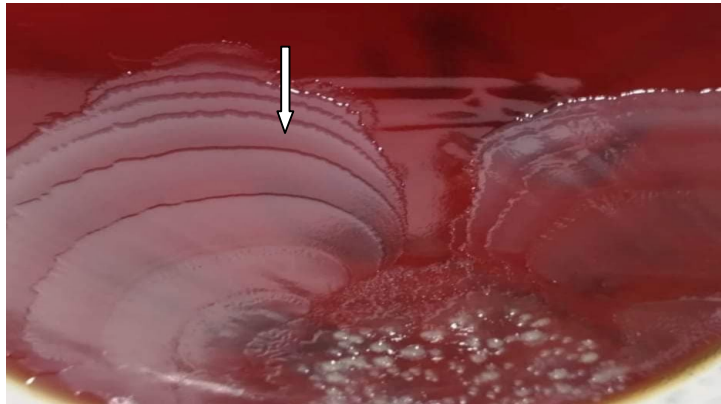


Figura 31: *Proteus* sp.- cultură pe mediul geloză-sânge (fenomenul de invazie)

Testele biochimice definesc genul (G+, L-, H<sub>2</sub>S, Mobilitate +, Uree +, citrat +), dar diferențiază și speciile de *Proteus* între ele. Toate speciile de *Proteus* sunt mobile (fenomenul de catarare, de invazie), produc urează și secretă fenilalanindezaminază (FAD).

În scop epidemiologic pentru stabilirea sursei unei infecții nosocomiale se poate o tehnică simplă : linia de demarcație a lui Dienes - de a stabili apartenența unor tulpini de *Proteus* unuia sau mai multor serotipuri. Tulpinile de *Proteus* izolate se însămânțează pe o placă cu geloză în puncte diferite și se incubează 18-24 de ore la 37°C. Fiecare tulpină va crește sub formă de valuri

concentrice. Dacă tulpinile aparțin aceluiași serotip (deci, provin din aceeași sursă), valurile de invazie se suprapun, iar dacă tulpinile sunt diferite, la locul de întâlnire a valurilor de expansiune apare o linie de demarcație de 2 - 3 mm, care le delimitează.



Figura 32: *Proteus* sp.-fenomenul Dienes prezent - mediul geloză-sânge

**Sensibilitatea la antibiotice.** Antibiograma este obligatorie pentru fiecare tulpină izolată, deoarece în special tulpinile izolate din infecțiile nosocomiale prezintă multirezistență la antibiotice.

Fenotipurile de rezistență sunt asemănătoare celor descrise la *E.coli*. Din nefericire, colistinul nu poate fi administrat în tratamentul infecțiilor produse de aceste tulpini, deoarece sunt natural rezistente la colistin.

## 5.6 Genurile *Morganella* și *Providencia*

Multă vreme clasificarea germenilor din genul *Proteus* a fost foarte controversată, apoi genul a fost scindat în 3 genuri: *Proteus*, genul *Morganella* și genul *Providencia* (care se diferențiază pe baza proprietăților biochimice). Astfel, în urma propunerii lui Bremer, din 1979, specia *Proteus morganii* a fost reconsiderată și ridicată la rangul de gen. În prezent genul *Morganella* cuprinde o singură specie *Morganella morganii* (fostul *Proteus morganii*). De asemenea, specia *Proteus rettgeri* a fost inclusă în genul *Providencia*, care, în prezent, cuprinde 6 specii. Cele 3 genuri au fost incluse în tribul *Proteeae*. Identificarea se face biochimic.

Produc infecții urinare mai ales la pacienții cateterizați, dar și în alte infecții cu caracter nosocomiale. Tratamentul acestora este dificil, deoarece tulpinile au dobândit un grad înalt de rezistență. Tulpinile de spital sunt în general multirezistente la antibiotice. Din nefericire, colistinul nu poate fi administrat în tratament, deoarece sunt natural rezistente la colistin.



## 6. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU BACILI GRAM NEGATIVI NON-FERMENTATIVI

### 6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (bacilul piocianic) face parte din genul *Pseudomonas*, care cuprinde bacili gram negativi, strict aerobi, cu dispoziție necaracteristică, mobili, oxidazo-pozitivi, care nu utilizează glucoza pe cale fermentativă (**non-fermentaivi**) și sunt nesporulați. *Pseudomonas aeruginosa* a fost izolat din apă, sol, aer și se găsește foarte frecvent răspândit în spitale, acolo unde există umezeală: toalete, vase cu flori, echipamentul de respirație artificială, unele dezinfectante. Are un metabolism foarte activ, fiind izolat chiar și în apa distilată, în care metabolizează orice urme minime de substanțe. Portajul permanent uman este în jur de 6% la personale sănătoase, 38% la cei spitalizați pentru o perioadă mai lungă și 78% la persoanele imunodeficiente.

**Semnificația clinică.** Cu toate că dispune de o mare varietate de factori de virulență, *P. aeruginosa* este prin excelență un germen condiționat patogen. La gazda vulnerabilă produce infecții grave, greu de tratat.

Bacilul piocianic face parte din categoria germenilor de spital, fiind responsabil de producerea unor infecții nosocomiale severe, fiind prezent în special în sălile de dializă, terapie intensivă, cu profil chirurgical, precum și la pacienții cu fibroză chistică.

**Diagnosticul** infecțiilor produse de bacilul piocianic este bacteriologic. Simpla izolare dintr-un produs patologic însă, în lipsa unui context clinic corespunzător, nu îl implică în mod obligatoriu ca agent cauzal al unei infecții. Astfel, dacă într-un exudat faringian al unui pacient care a urmat un tratament cu antibiotice izolăm bacil piocianic, ar fi o greșeală să-i mai administrăm antibiotice și împotriva acestui germen, care a apărut ca urmare a selecției produse de antibioterapia anterioară și s-a dezvoltat în lipsa florei normale concurente.

**Recoltarea** produselor se face în funcție de localizarea infecției.

**Examenul direct** al produselor are valoare orientativă numai dacă produsul recoltat este în mod normal steril (LCR, exudate). Pe preparatele colorate Gram se vor observa PMN și bacili gram negativi.

**Izolarea** bacilului piocianic se poate face pe orice mediu de cultură, deoarece este un germen nepretențios, cu posibilități metabolice nelimitate. Totuși, mediul se alege în funcție de produsul recoltat. Produsele natural sterile se însămânțează pe geloză-sânge, sângele pentru hemocultură va fi prelevat în condiții de strictă asepsie și însămânțat în flaconul de hemocultură a cărui compoziție favorizează dezvoltarea germenilor aerobi, materiile fecale pe medii selective. Plăcile se incubează la 37°C. *P. aeruginosa*, spre deosebire de alte specii ale genului se dezvoltă și la 42°C.

**Identificarea** bacilului piocianic este simplă datorită caracterelor sale culturale. Pe geloză simplă sau bulion înverzește mediul datorată secreției unui pigment fenazinic albastru, nefluorescent, solubil în apă - piocianina, care se combină cu pioverdina, fluorescentă. Există și tulpini acromogene, sau tulpini care secretă un pigment roșu fluorescent (piorubina) sau brun (piomelanina). Cultura are de obicei un miros de flori de salcâm datorită degajării de aminoacetofenonă.

Pe geloză-sânge coloniile sunt mari, cenușii, hemolitice și pot avea uneori un luciu metalic, care reprezintă zone de autoliză. Pe aceeași placă pot coexista mai multe variante de colonii (S, R.

mucoase), ceea ce creează impresia prezenței mai multor specii microbiene. Pe bulion, bacilul piocianic crește la suprafața mediului, sub forma unei pelicule, pentru că este strict aerob. Pe mediile lactozate, piocianicul dă colonii lactozo-negative.

Identificarea tulpinilor acromogene se face pe baza testelor biochimice. Pe piață există o mare varietate de kituri disponibile care permit identificarea pe baza testelor biochimice:

- manuale: API 20NE (Biomerieux), rapID NF Plus (Remel),
- automate: Vitek2 GNI, MicroScan, BD Phoenix, sau prin spectrometrie de masă **MALDI-TOF**.

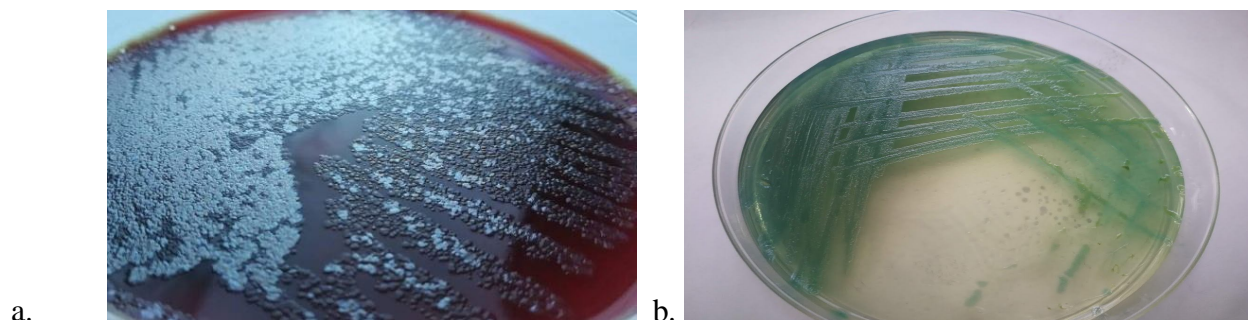


Figura 33: *P.aeruginosa* (a) cultură pe mediul geloză-sânge cu prezența luciului metalic, (b) cultură pe mediul diferențial-CHROMagar UTI –producere de pigment verde

**Sensibilitatea la antibiotice.** *P. aeruginosa* este sensibil în mod natural la penicilinele anti-pseudomonas (carbenicilină, ticarcilină, piperacilină, mezlocilină, azlocilină), la cefalosporine din generația a III-a (cefoperazonă, cefotaxim, ceftazidime), la aminoglicozide (gentamicină, tobramicină, amikacină), precum și la fluoquinolone (ciprofloxacina), aztreonam și imipenem. Este de regulă rezistent la peniciline, macrolide, lincosamide, cefalosporine de generația I și II, tetraciclina, cloramfenicol și biseptol. *P. aeruginosa* este un germen care dobândește foarte repede rezistență la antibiotice, tulpinile periculoase de spital fiind uneori rezistente la aproape toate antibioticele enumerate.

Tot mai multe spitale de pretutindeni au început să raporteze o creștere alarmantă a prevalenței tulpinilor carbapenem-rezistente. În cazul acestor tulpini, colistinul pare a fi antibioticul de rezervă. De asemenea, la pacienți cu fibroză chistică rezistența la antibiotice este în prezent unul dintre cele mai importante probleme cu care se confruntă medicii. Tratamentul infecțiilor produse de bacilul piocianic la pacienți cu imunitatea deprimată este foarte dificil, deoarece acțiunea antibioticului nu este eficientă în condițiile scăderii rezistenței antiinfecțioase a organismului.

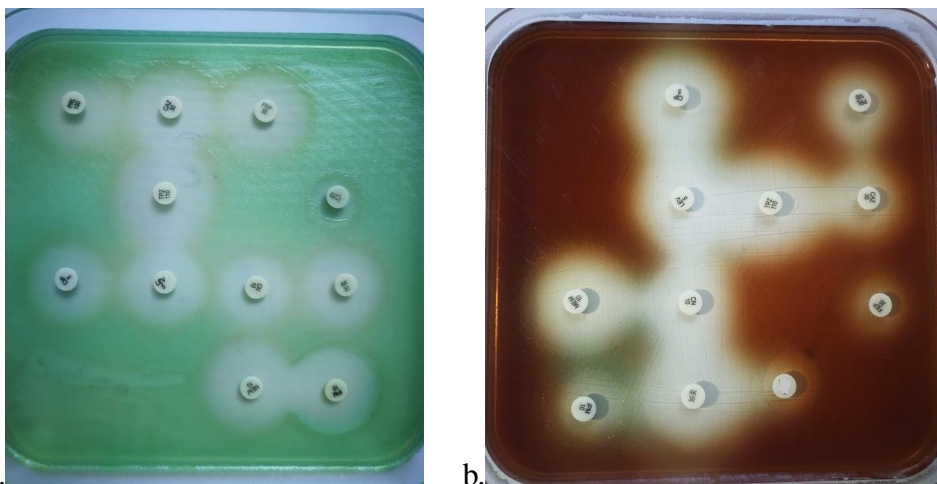


Figura 34: *P.aeruginosa* antibiogramă difuzimetrică, (a) tulpină secretoare de pioverdină, (b) tulpină secretoare de piomelanină

### 1.7. *Acinetobacter baumannii*

Genul *Acinetobacter* cuprinde bacili gram negativi de formă cocică, bacilară, sau cocobacilară, aerobi și oxidazo-negativi. Pe același frotiu se pot întâlni forme cocoide și forme filamentoase cu o lungime de câteva zeci de micrometri. Germeii din acest gen sunt imobili, frecvent încapsulați. Cresc bine pe majoritatea mediilor de cultură. Sunt larg răspândiți în natură (sol, apă, lapte, alimente), precum și în mediul spitalicesc (ventilatoare, umidificatoare, catetere).

*A. baumannii* este reprezentantul tip al genului, infecțiile cauzate de această specie sunt asociate cu o mortalitate și morbiditate mai ridicate datorită virulenței sale relativ ridicate și rezistenței antimicrobiene în comparație cu alte specii.

**Semnificația clinică.** Principalele probleme cauzate de *Acinetobacter spp.* în mediul spitalicesc se referă în principal la pacienții cu boli critice internați în Unitățile de Terapie Intensivă, în special la cei care necesită ventilație mecanică, la pacienții cu leziuni extinse cutanate sau arsuri (pacienți cu politraumatisme).

Infecțiile asociate cu *Acinetobacter spp.* includ pneumonia asociată ventilației artificiale, infecții ale pielii și țesuturilor moi, ale rănilor, ale tractului urinar, peritonită, meningită secundară și septicemie. Astfel de infecții sunt cauzate predominant de către membrii complexului *A. baumannii*; infecțiile cauzate de alte specii ale genului sunt relativ neobișnuite și sunt restricționate în principal la infecții ale sângelui legate de utilizarea cateterelor. Rareori, *A. baumannii* provoacă infecții dobândite în comunitate, descrise în special la persoanele imunodeprimăte (alcoolici, diabetici, neoplazici) și sunt de tipul: pneumonii, meningite, celulate, bacteriemii.

**Diagnosticul** este bacteriologic. Ca și în cazul bacilului piocianic, simpla izolare dintr-un produs patologic, în lipsa unui context clinic coresponzător, nu îl implică în mod obligatoriu ca agent cauzal al unei infecții.

**Recoltarea** produselor se face în funcție de localizarea infecției: spută, aspirat bronșic, puroi, urină, sânge, LCR, catetere.

**Examenul direct** al produselor are valoare orientativă numai dacă produsul recoltat este în mod normal steril (LCR, exudate). Pe preparatele colorate Gram se vor observa PMN și prezența de bacili sau cocobacili gram negativi. Uneori au tendința de a păstra cristal violetul și, prin urmare, să fie identificate incorect ca fiind coci gram pozitivi.

**Izolarea** se poate face pe orice mediu deoarece este un germen nepretențios, cu posibilități metabolice nelimitate. Majoritatea tulpinilor de *Acinetobacter spp.* sunt metabolic versatile și pot fi cultivate ușor pe medii microbiologice simple, formând colonii netede, cu un diametru de aproximativ 2 mm, unele dintre ele fiind pigmentate galben pal sau gri.

Intervalul de temperatură este tipic bacteriilor mezofile; speciile relevante din punct de vedere clinic cresc optim la 37 ° C, în timp ce speciile izolate din mediu pot prefera temperaturi mai scăzute. Culturile în mediu mineral ușor acid, conținând acetat și nitrat ca surse de carbon și azot, respectiv, în mediu selectiv Leeds sau pe agar selectiv similar disponibil în comerț, pot îmbunătăți depistarea *Acinetobacter spp.* din probele cu floră polimorfă și pot fi utilizate pentru îmbogățirea probelor clinice și de mediu.

Activitatea hemolitică pe plăci de geloză-sânge 5% este observată ocazional, iar hidroliza gelatinei și ureei, precum și formarea acidului din glucoză sunt de asemenea trăsături variabile. Testele de mai sus permit identificarea genului, dar identificarea *Acinetobacter* la nivelul speciilor individuale se poate realiza pe baza testelor biochimice.

**Identificarea** se face pe baza caracterelor culturale. Coloniile sunt de tip S, având 1 - 2 mm diametru, mucoide, cu suprafețe netede, lucioase sau mate, de cele mai multe ori nepigmentate (unele cu pigment galben pal sau gri). Activitatea hemolitică pe plăci de geloză-sânge 5% este observată ocazional, unele specii produc hemoliză beta pe geloză-sânge. Cresc până la temperatura de 44 ° C. Reacția oxidazei este negativă.

Aceste bacterii nu fermentează glucoza (germen nefermentativi), sunt catalazo pozitivi, oxidazo negativi, lactozo negativi.

Identificarea la nivel de specie se face pe baza caracterelor de cultivare (temperatura de creștere) și a caracterelor biochimice. Pentru confirmare, se utilizează produse comerciale de tipul sistemelor microtest - API și sistemului automat Vitek, care permit identificarea pe baza testelor biochimice, sau prin spectrometria de masă **MALDI-TOF**.



Figura 35: *A.baumannii* –cultură pură pe mediul solid diferențial CHROM agar UTI

**Sensibilitatea la antibiotice:** sunt rezistenți la peniciline și cefalosporinele de generația I și II. Sunt sensibili la gentamicină, amikacină, tobramicină și la cefalosporinele de generația III și IV. Rata rezistenței la carbapeneme a crescut în ultima perioadă în rândul tulpinilor nosocomiale. Infecția cauzată de *A. baumannii* este deseori severă și dificil de tratat, datorită ratelor ridicate de rezistență la principalele clase de antibiotice. Deși sulbactamul este bactericid pentru *Acinetobacter spp.*, rata de rezistență este, de asemenea, în creștere. Carbapenemii (în special imipenemul și meropenemul) au fost odată foarte eficienți *in vitro*; acum rata de rezistență ale *A. baumannii* a crescut la mai mult de 50%. Aceste specii rezistente la carbapeneme sunt, de obicei, non-sensibile

și la alți agenți antimicrobieni convenționali. Susceptibilitatea la polimixine sau tigeciclină rămâne o opțiune terapeutică. Sensibilitatea la minociclină este de asemenea ridicată.

Tulpinile multi-rezistente (MDR) prezintă rezistență la mai mult de două, din următoarele 5 clase de antibiotice:

- cefalosporine antipseudomonas (ceftazidime sau cefepime),
- carbapeneme antipseudomonas (imipenem sau meropenem),
- ampicilină/sulbactam,
- fluoroquinolone (ciprofloxacin sau levofloxacin)
- aminoglicozide (gentamicină, tobramicină, sau amikacină).

Tulpinile extensiv-rezistente (XDR) își păstrează sensibilitatea la colistin, acesta fiind de cele mai multe ori antibioticul de rezervă. Există însă, și tulpini nosocomiale de *Acinetobacter baumannii* pan-rezistente (PDR), adică rezistente la toate clasele de antibiotice, față de care tot arsenalul terapeutic existent în prezent devine inefficient. Sunt izolate în special din secțiile de terapie intensivă.

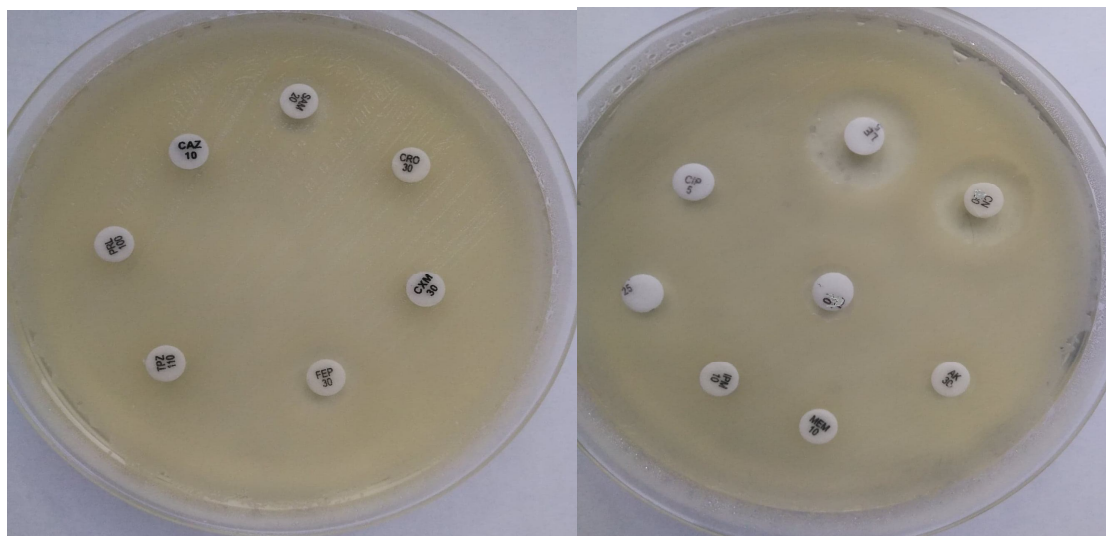


Figura 36: *A.baumannii* – antibiogramă difuzimetrică (tulpină multi-rezistentă)

## 7. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU ALTE TIPURI DE BACILI GRAM NEGATIVI AEROBI

### 7.1. Genul *Campylobacter*

Genul cuprinde 11 specii, din care importante pentru patologia umană sunt *C. jejuni* cu subspeciile *jejuni*, *doylei* și *C. coli*.

Din punct de vedere morfologic, germenii din genul *Campylobacter* sunt bacili gram negativi, nesporulați, de formă spiralată, încurbată sau asemănătoare literei “S”. Sunt prevăzuți cu un singur flagel polar la una sau ambele extremități, ceea ce le conferă o mobilitate caracteristică. În culturi mai vechi de 48 de ore, pe medii solide și lichide sau după pasaje repetate se pot observa forme rotunjite de 0,5 μm sau mai mari, denumite “corpi cocoizi”. Aceste forme reprezintă un stadiu de “degenerare” a bacteriilor sub influența condițiilor de creștere. Sunt microorganisme microaerofile, unele specii putând crește și în condiții de aerobioză sau chiar de anaerobioză.

**Semnificația clinică.** *C. jejuni* și *C. coli* sunt implicate în boala diareică acută (BDA) la om, cu o frecvență ce rivalizează cu cea a enterobacteriilor clasice (*Salmonella* și *Shigella*). Cele mai frecvente infecții sunt cele gastro-enterale, manifestate prin dureri abdominale, scaune diareice, uneori chiar sanguinolente (mai ales în sectorul pediatric) și rareori vomă. Factorii de risc ai BDA în sectorul pediatric sunt: spitalizarea prelungită, tratamentul cu antibiotice, corticosteroizi, starea organismului. Infecțiile extraenterale au fost semnalate mai rar, în special la persoanele cu deficiențe imune (în aceste cazuri germenii au putut fi izolați și din hemoculturi). Diagnosticul de laborator este bacteriologic și serologic.

**Recoltarea.** Se recoltează materii fecale, vomismente, mai rar sânge pentru hemocultură, precum și produse alimentare ca de pildă carne (tacâmuri, carcase de pasăre, ficat și carcase de porc), lapte și produse lactate. Transportul materiilor fecale nu prezintă dificultăți, deoarece cele două specii rezistă cel puțin trei zile la temperatura camerei și o săptămână la 4°C.

**Izolarea.** Speciile din genul *Campylobacter* sunt microorganisme cu exigențe de cultivare deosebite și necesită condiții speciale:

- o atmosferă de incubare optimă (microaerofilie) reprezentată de un amestec de 85%N<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub> și 10%CO<sub>2</sub>, greu de realizat în condiții curente de lucru. Condițiile de microaerofilie pot fi obținute cu ajutorul unui jar de anaerobioză în care se introduce amestecul reducător (preparate comerciale de tipul Campy Pak, Gas Pak) sau cu un exicator cu lumânare;
- medii de cultură speciale;
  - > *medii de îmbogățire:* sunt necesare când produsul patologic provine de la bolnavi aflați în convalescență, când transportul s-a efectuat în condiții nepotrivite, precum și în microbiologia alimentară, când procedeul îmbogățirii devine imperios necesar. Exemple de medii de îmbogățire (bulion Brucella, mediul Preston, mediul Park-Sanders etc.);
  - > *medii neselective:* (geloză-chocolat) pot fi utilizate în coproculturi, dar pentru eliminarea celorlalte bacterii contaminante, fără utilizare de antibiotice; se întrebuițează o tehnică de filtrare. Se folosesc filtre puse direct pe mediul solid, pe care se depune o picătură din supernatantul suspensiei de materii fecale, timp de 30', după care filtrul se îndepărtează și se face incubarea. Când recoltarea se face cu tamponul, acesta se descarcă direct pe filtrul aflat pe mediul de cultură, întrucât, datorită dimensiunilor mici și a mobilității lor, campilobacteriile pot străbate filtrele, spre deosebire de enterobacterii, care sunt reținute;

> *medii selective*: diversele medii utilizate se deosebesc prin amestecul de antibiotice folosite (vancomicină, trimetoprim, polimixina B, colistin, amfotericin B, novobiocină, rifampicină) și procentul de sânge de cal sau berbec utilizat în formulă, cele mai selective medii fiind cele cu conținut de cefalosporine (cefalotină, cefoperazonă). Astfel de medii sunt *Campy agarul*, *geloză-chocolat* cu adaos de sânge de berbec și antibiotice (vancomicină, rifampicină, cefalotin), *mediul Skirrow* (agar, sânge de cal, antibiotice), *mediul Butzler* (thioglicolat, sânge de berbec, antibiotice) etc.;

- o temperatură optimă de incubare la 42°C-43°C, în condițiile de microaerofilie descrise, timp de 48-72 de ore. Incubarea timp de trei zile duce la creșterea rezultatelor pozitive cu aproximativ 5%. Se incubează duplicate din plăcile însămânțate și la 37°C, care se examinează după 4-5 zile. La hemoculturi incubarea se poate prelungi chiar peste 2 săptămâni.

Însămânțarea pe medii multiple și în condiții de temperatură diferită crește probabilitatea de izolare a unor tulpini care sunt inhibitate de unele medii sau preferă o temperatură de 37°C.

**Identificarea. Examen microscopic al coloniilor.** Examinarea preparatului nativ lamă-lamelă, la microscopul cu fond întunecat, relevă prezența bacteriilor care prezintă mișcări active “în zbor de musculiță” datorită flagelului polar.

Pe frotiurile colorate Gram sau Giemsa se observă bacterii subțiri cu o morfologie caracteristică, încurbate, spiralate, în formă de virgulă, sau forma literelor “S”, “Y”.

**Caractere culturale.** Coloniile tipice de *Campylobacter* sunt: punctiforme, nehemolitice, cu tendința de scurgere de-a lungul liniei de însămânțare, convexe, netede, translucide, incolore sau de culoare gri, de cca 1 mm diametru. Pentru teste suplimentare de identificare, însămânțarea se face pe mediul Mueller-Hinton cu 5% sânge de berbec. Teste orientative de identificare sunt:

- mobilitatea caracteristică în preparatul nativ, datorată flagelului polar;
- caracterul gram negativ și morfologia caracteristică;
- caracterul oxidazo-pozitiv;
- aceste bacterii nu produc urează. *C. jejuni* se diferențiază de *C. coli* prin faptul că nu produce H<sub>2</sub>S.
- creșterea preferențială în condiții de microaerofilie.

Identificarea se bazează pe teste biochimice, care pot fi realizate prin metode manuale, pe galerii de tip API CAMPY sau teste rapide de identificare a antigenului din materii fecale.

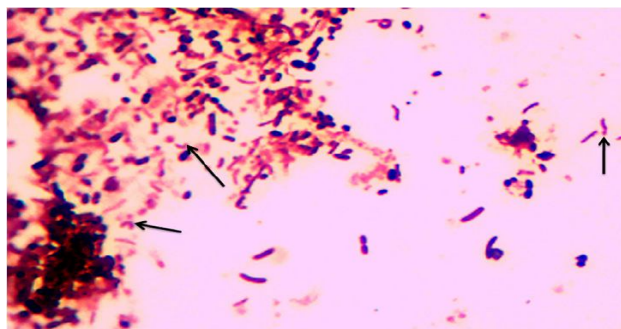


Figura 37 : *Campylobacter* sp. - examen microscopic



Figura 38: *Campylobacter* sp. – cultură

**Diagnostic serologic:** Reacția de fixare a complementului (RFC) pentru *Campylobacter fetus* și imunoenzimatică (EIA) pentru *Campylobacter jejuni*, evidențiază nivelul crescut de anticorpi anti-*Campylobacter* și indică de obicei, o infecție recentă sau în curs de desfășurare (se recomandă în special în artrita reactivă și sindromul Guillan-Barré), chiar dacă culturile din materii fecale pot fi negative.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Tulpinile microbiene izolate de la gazde umane, spre deosebire de cele izolate de la alte mamifere și păsări, sunt sensibile la eritromicină, tetraciclină, cloramfenicol, nitrofurantoin, tobramicină. Cercetările indică faptul că tulpinile izolate la păsări sunt mai puțin sensibile la eritromicină și tetraciclină, probabil datorită folosirii oxitetraciclinei în sectorul de creștere intensivă a păsărilor. Se recomandă antibiograma.

## 7.2. *Helicobacter pylori*

Germenii din specia *Helicobacter pylori* se aseamănă, din punct de vedere morfologic, cu cei din genul *Campylobacter*. Sunt bacterii gram negative, încurbate sau spiralate, cu dimensiuni de 0,5 μm, prezentând 4-6 flageli localizați la un pol al bacteriei. La microscopul electronic pot avea forma literei "S", sau pot fi cocoide.

**Semnificația clinică.** Există evidențe certe asupra rolului lor în etiologia ulcerelor peptice, al gastritelor idiopatice (prezența microorganismului la nivelul mucoaselor determină un aflux puternic de neutrofile și alte celule inflamatorii), precum și în dispepsia nonulceroasă. Rolul lor în producerea bacteriemiei este incert. S-au citat cazuri experimentale, în care aceste microorganisme au fost izolate și din hemoculturi.

Diagnosticul de laborator este bacteriologic și serologic.

**Recoltarea.** Se recoltează fragmente de mucus gastric obținute endoscopic, fragmente de periaj gastric, precum și aspirat gastric. Izolarea din hemoculturi este doar în stadiu de experiment.

Utilizarea mediilor de transport este necesară pentru a proteja fragmentele biotice de desiccare în urma contactului cu oxigenul atmosferic, importantă fiind menținerea probei la 4°C. Când transportul nu depășește intervalul de 4 ore, se poate utiliza în acest scop ser fiziologic steril. În caz contrar, pentru intervale de timp cuprinse între 4 și 18 ore pot fi utilizate medii de transport, de tipul mediului semi-solid "Portagerm pylori" (produs al firmei Biomerieux).

**Examenul microscopic.** Pentru frotiurile din materialul biptic se utilizează (cu rezultate satisfăcătoare) colorații de tipul Giemsa (cea mai recomandată și accesibilă), Gram, Hematoxilină - Eozină (bacteriile apar de culoare roz), colorația Warthin-Starry, utilizată și în anatomia patologică (bacterii negre pe fond deschis) sau imunofluorescența. Sunt bacterii încurbate, spiralate, gram negative.

**Izolarea.** Se utilizează o gamă largă de medii selective (cu adaosuri de antibiotice), precum și neselective (geloză-sânge, geloză-chocolat), principala condiție fiind suplimentarea lor cu sânge 10% (uman, de cal sau de berbec) iar a celor selective și cu un amestec de agenți antimicrobieni (alții decât cei folosiți la *Campylobacter*) în scopul evitării contaminării fungice și bacteriene. Exemple de medii selective:

- mediul *Helicobacter pylori*: cu conținut de vancomicină, trimetoprim, cefsulodin, amphotericin B);
- mediul *Marshal* cu infuzie de cord- creier, adaos de sânge de cal și o asociație de antibiotice: vancomicină, ac. nalidixic, amphotericină;
- mediul *Wilkins Chalgren*, suplimentat cu sânge uman 10% și cu vancomicină, trimetoprim, cefsulodin, amphotericin;
- mediul *Pylori agar* (produs comercial bioMerieux),
- mediul Skirrow-Campylobacter, etc.

**Reguli generale de însămânțare.** Însămânțarea se face direct sau după o prealabilă omogenizare a fragmentului biptic cu ajutorul omogenizatorului electric. De regulă, însămânțarea se face concomitent pe un mediu neselectiv (geloză-sânge) și unul selectiv în așa fel încât fragmentul biptic să fie rulat pe toate fețele pe suprafața mediului de cultură (germenul putând fi



ascuns la nivelul criptelor mucoasei), iar apoi cu ajutorul ansei bacteriologice după tehnica cunoscută a coloniilor izolate. Plăcile se incubează în atmosferă de microaerofilie (CO<sub>2</sub> 7-12%, H<sub>2</sub> 0-85%, N 0-85%, O<sub>2</sub> 5-6%), după tehnica descrisă la *Campylobacter*, la 37°C, timp de peste 7 zile, cu prima citire la cca 4 zile.

**Identificarea.** *H. pylori* produce colonii translucide, cu un diametru de 1-2 mm, oxidazopozitive, care au crescut în condiții de microaerofilie. Un test biochimic foarte important este producerea de urează. *H. pylori* are proprietatea de a hidroliza ureea din mediu în amoniac în 5-20 minute, fapt observabil prin virarea indicatorului de pH din mediu, din galben și roșu. Testul ureazei este un test screening în identificarea *H. pylori*, atât în laborator cât și în cabinetul de consultație.

**Tehnica.** Se înțeapă coloana de mediu (mediu uree-agar) fie direct, având în ansa bacteriologică fragmentul de mucoasă, fie colonia microbiană (atunci când testul se efectuează după izolarea germenumi). Reacția are loc la temperatura camerei, fiind ușor vizibilă cu ochiul liber. Prezintă o sensibilitate de 85-95%, dar atunci când s-a efectuat direct din produsul patologic trebuie confirmată în mod obligatoriu prin cultură. Identificarea este posibilă și prin utilizarea galeriilor manuale API CAMPY.

*H. pylori* mai poate fi diagnosticat prin reacții antigen-anticorp:

- Identificarea anticorpilor anti *H. pylori* în serul pacienților. Este cel mai frecvent utilizat având disponibile teste rapide imunocromatografice sau imunoenzimatic. Rezultatul negativ exclude infecția iar cel pozitiv nu arată dacă infecția este recentă.
- Identificarea antigenelor *H. pylori* în materiile fecale prin teste rapide imunocromatografice sau prin PCR.

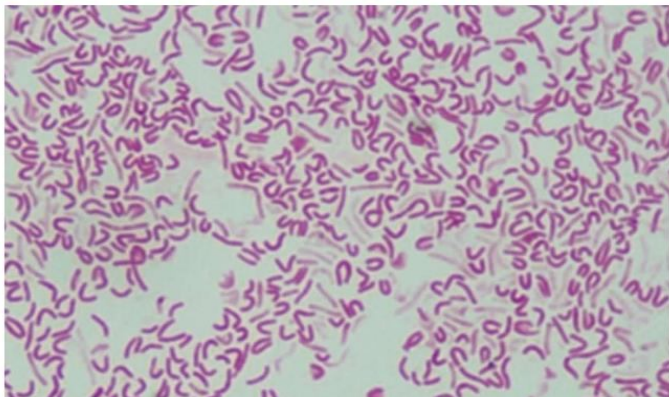


Figura 39: *H. pylori*- examen microscopic- clorație Gram



Figura 40: *H. pylori* – cultură: mediul TSA (Trypticase Soy Agar)

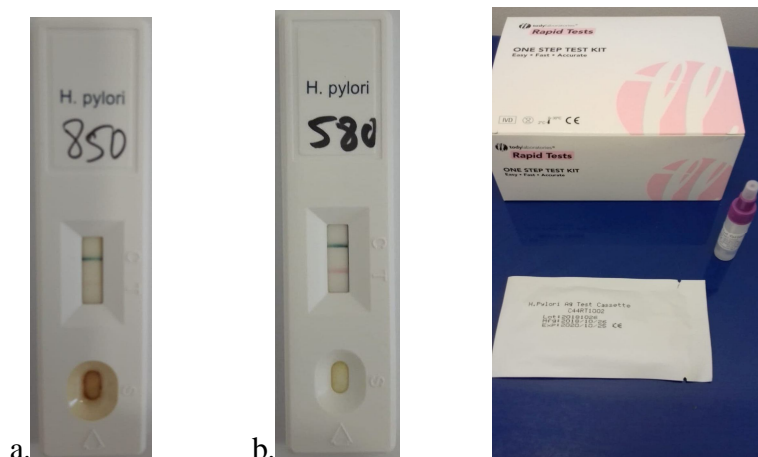


Figura 41: *H. Pylori* -Test rapid imunocromatografic; (a) negativ, (b) pozitiv

**Sensibilitatea la antibiotice.** *Helicobacter pylori* este sensibil la o gamă largă de antibiotice, cum sunt eritomicină, tetraciclină, penicilina G, gentamicină, cefalotin, clindamicină, ciprofloxacina, nitrofurantoin, rifampicină, metronidazol, etc.. Este în mod natural rezistent la cefsulodin, acid nalidixic, sulfonamide, trimetoprim, vancomicin etc.

Testarea sensibilității *in vitro* se face prin metoda difuzimetrică, utilizându-se câte o singură placă cu geloză-sânge pentru fiecare comprimat antimicrobian datorită zonelor mari de inhibiție produse. Se face în mod selectiv, doar pentru antibioticele cuprinse de obicei în schema terapeutică: metronidazol, tetraciclină, amoxicilină. Claritromicina este unul din cele mai noi macrolide introdusă în tripla terapie (bismut + metronidazol + amoxicilină) a acestor infecții în locul metronidazolului, motiv pentru care a fost introdus și în cadrul bateriei de antibiotice cu care se face testarea. Tripla terapie include o asociere de doua antibiotice și antiacide (inhibitori ai pompei de protoni): omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol sau inhibitori ai receptorilor  $H_2$  histaminergici (cimetidine, ranitidine, famotidina) administrat timp de doua săptămâni.

### 7.3. Genul *Haemophilus*

Genul *Haemophilus* cuprinde cocobacili gram negativi, cu morfologie variată, de la cocobacili la filamente, gram negativi, facultativ-anaerobi, imobili, nesporulați și încapsulați atunci când sunt izolați în infecții invazive. Germenii din acest gen sunt pretențioși și necesită pentru cultivare factor X (hemină) și factor V (NAD) prezenți în sânge, de aici apărând și numele genului.

**Semnificația clinică.** În prezent genul *Haemophilus* cuprinde peste 15 specii, fiind germeni cu parazitism obligatoriu pe mucoasa respiratorie și făcând parte din flora normală a tractului respirator la om și multe specii animale. *Haemophilus influenzae* (variantele necapsulate) și mai ales *Haemophilus parainfluenzae* colonizează tractul respirator al omului în primele săptămâni de viață, de unde pot iniția infecții cu gravitate variabilă. Astfel, *Haemophilus influenzae* este unul din principalii agenți etiologici ai meningitelor la copii, 93% aparținând biotipului I și serotipului capsular b. Uneori infecția cu *Haemophilus influenzae* poate evolua rapid spre laringotraheită obstructivă ce necesită intubarea copilului sau chiar traheotomie.

*Haemophilus ducreyi* este agentul patogen al șancrului moale, care este o boală veneriană.

Diagnosticul infecțiilor cu *Haemophilus* este bacteriologic.

**Recoltarea.** Probele se recoltează în funcție de localizarea infecției: sânge, LCR, puroi, secreție conjunctivală, auriculară, spută, aspirat traheo-bronsic. În șancrul moale Ducrey se recoltează exudatul de la marginea și baza leziunii. Se impune transportul imediat al sângelui și LCR-ului.

În infecții respiratorii recoltarea cu tampoane nu este cea mai potrivită metodă (deși este acceptată mai ușor de pacienți), deoarece produsele vor conține inevitabil floră de asociație. Este preferabilă, în aceste cazuri, recoltarea prin alte tehnici, ca de exemplu aspiratul transtraheal.

**Examenul direct.** LCR va fi cât mai rapid centrifugat, iar sedimentul va fi examinat microscopic. Frotiurile vor fi fixate la flacără sau cu metanol absolut (10 minute), apoi colorate Gram. Se va da atenție etapei de decolorare, deoarece *Haemophilus* poate fi confundat morfologic cu pneumococii. În general însă, are aspect pleomorf. Se întâlnesc cocobacili, bacili scurți, lungi sau forme filamentoase. Pe frotiurile efectuate din șancrul Ducrey, germeii au așezare caracteristică în “bancuri de pește” și în lanțuri lungi.

Dacă germeii prezintă capsulă se poate face identificarea directă prin reacția de umflare a capsulei, cu ser anticapsular specific de tip, sau prin imunofluorescență directă, cu anticorpi conjugați cu fluoresceină. Pentru detectarea *H. influenzae* și *H. ducreyi* există seruri monoclonale. Alte metode de detectare directă sunt: *latex-aglutinarea*, *coaglutinarea*, *Elisa*, *RIA*.

**Izolarea.** LCR se însămânțează pe medii care conțin factorii de creștere X și V. Se recomandă însămânțarea produselor, în paralel pe geloză-chocolat (suplimentând cu factorii respectivi) și pe geloză-sânge, pe care se însămânțează produsul patologic și în plus o tulpină de stafilococ care va produce factorul V și favorizează creșterea tulpinilor de *Haemophilus* spp. (fenomenul de “satelitism”).

Pentru izolarea din secreții purulente, exudate, se utilizează, de asemenea, geloză-chocolat, care este de preferat cultivării prin satelitism. Coloniile sunt de tip S sau M, având un diametru de 0,5-0,8 mm în primele 24 de ore și de 1-2 mm după 48 de ore, pe geloză-chocolat coloniile fiind comparate cu picături de rouă. Nu sunt hemolitice. Produsul recoltat din șancru conține de obicei floră mixtă, motiv pentru care este indicată utilizarea unui mediu semiselectiv (cu vancomicină).

Plăcile însămânțate se incubează la 35-37°C (cu excepția celor însămânțate din șancru - *H. ducreyi* crește mai bine la 33°C) în atmosferă umedă cu 5-10% CO<sub>2</sub>. Durata incubării depinde de specie. Majoritatea speciilor se dezvoltă în 24 ore, dar *H. aegypticus* necesită 2-4 zile, iar *H. ducreyi* peste 9 zile.

**Identificarea.** Fenomenul de satelitism (creșterea în jurul coloniilor de stafilococ) este un test preliminar de identificare. El evidențiază utilizarea factorului V, oferit de tulpina de stafilococ.

Pentru identificarea speciei de *Haemophilus*, se însămânțează tulpina de cercetat pe mediul de cultură pe care se depun microcomprimate impregnate cu factor X, V, XV. În funcție de creșterea din jurul microcomprimatelor se identifică speciile de *Haemophilus* (*H. influenzae* crește în jurul comprimatului XV, *H. parahaemolyticus* și *H. parainfluenza* în jurul comprimatelor V și XV, iar *H. ducreyi* în jurul comprimatelor X și XV). Alte teste de identificare se bazează pe caracterele biochimice. Producerea de indol, urează și ornitin-decarboxilază diferențiază atât speciile între ele, cât și biotipurile din cadrul speciilor.

*Identificarea pe baza structurii antigenice* se aplică doar tulpinilor încapsulate ale *H. influenzae*. Pe baza antigenului capsular polizaharidic s-au identificat 6 serotipuri (a, b, c, d, e, f). Acestea pot fi identificate prin reacții de aglutinare pe lamă, coaglutinare, latex-aglutinare, reacția de umflare a capsulei, imunofluorescență, cel mai frecvent fiind tipul b.

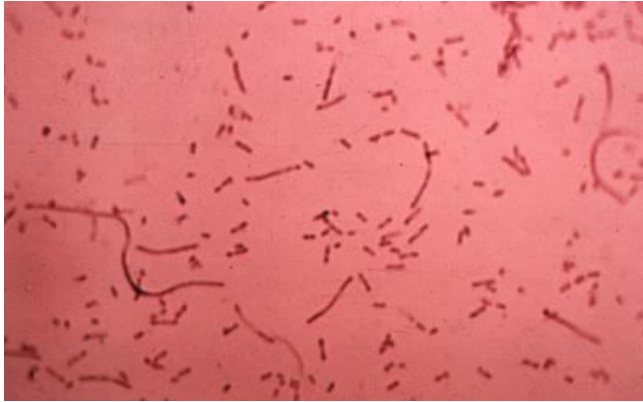


Figura 42: *H. influenzae* -Examen microscopic



Figura 43: *H. influenzae* : creștere în jurul microcomprimatului cu factorii X,V

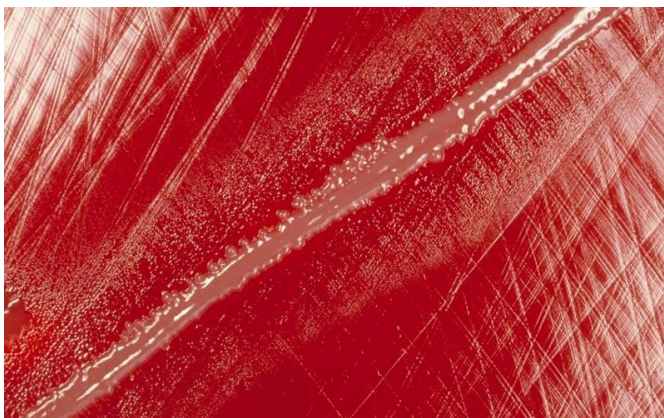


Figura 44: *H. influenzae*: Fenomenul de satelitism, mediul geloză-sânge

**Diagnostic serologic:** Identificarea prezenței de anticorpi față de *H. influenzae* prin RIA sau ELISA poate fi utilizată în verificarea răspunsului imun apărut în urma vaccinării.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Se efectuează antibiograma difuzimetrică folosindu-se mediul special HTM (*Haemophilus* test medium), germeii din genul *Haemophilus* fiind în mod natural sensibili la peniciline, cloramfenicol, sulfonamide, tetraciclina și cefalosporine.

## 8. DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC IN INFECȚIILE PRODUSE DE GERMI ANAEROBI

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

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

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

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

Există două grupe principale de germeni anaerobi:

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

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

2. **Germeni anaerobi endogeni, nesporulați, netoxigeni**, pot fi virulenți pentru om, deși habitatul lor natural este chiar mucoasa unor cavități naturale ale omului și animalelor.

### 8.1. Norme generale de conduită în diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de germeni anaerobi

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

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

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

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

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

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

**Examenul microscopic direct** pe preparatele colorate Gram este util în identificarea caracterelor morfologice și tinctoriale ale bacteriilor anaerobe din produsul patologic. Acest examen este esențial mai ales din punct de vedere clinic, întrucât majoritatea bacteriilor anaerobe necesită 48 de ore (sau mai mult) pentru creșterea pe mediile de cultură. Rezultatele examenului microscopic orientează medicul practician spre o terapie adecvată, înainte de efectuarea însămânțărilor și a antibiogramii, iar pe microbiolog asupra mediilor de cultură adecvate. Preparatele native (umed) între lamă și lamelă evidențiază prezența bacteriilor mobile.

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

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

Mediile neselective însămânțate vor fi incubate în anaerobioză pentru o perioadă de cel puțin 48 de ore înainte de expunerea la oxigen (se protejează astfel bacteriile aflate în faza logaritmică de creștere, de acțiunea toxică a oxigenului). Unele medii selective ca, de pildă, mediul BBE pentru grupul *B. fragilis* pot fi examinate după 24 de ore de incubare, deoarece aceste bacterii anaerobe au o creștere rapidă. Dacă pe mediile neselective nu se observă creșterea microbiană după 2 zile de incubare anaerobă, acestea vor fi reîncubate pentru încă 5 zile, perioadă necesară dezvoltării bacteriilor anaerobe pretențioase ca *Actinomyces* spp.

**Identificarea.** Infecțiile cu germeni anaerobi sunt, în general, polimicrobiene, izolarea diverselor specii fiind dificilă și de durată. Pentru identificare sunt utilizate caracterele culturale, morfotinctoriale, metabolice, precum și testele de patogenitate. Orice tulpină anaerobă izolată din produse normale sterile trebuie identificată. Identificarea anaerobilor, la nivel de specie, se face pe baza proprietăților biochimice. Sistemul API (Biomérieux) are o galerie de 20 și respectiv 32 de teste biochimice, bazate în special pe fermentarea unor zaharuri și producerea unor enzime.

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

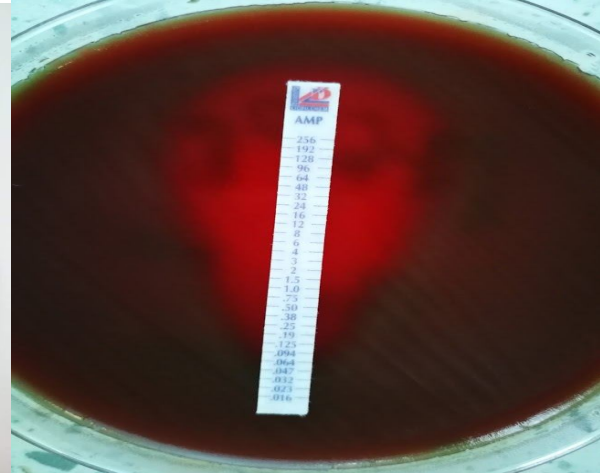
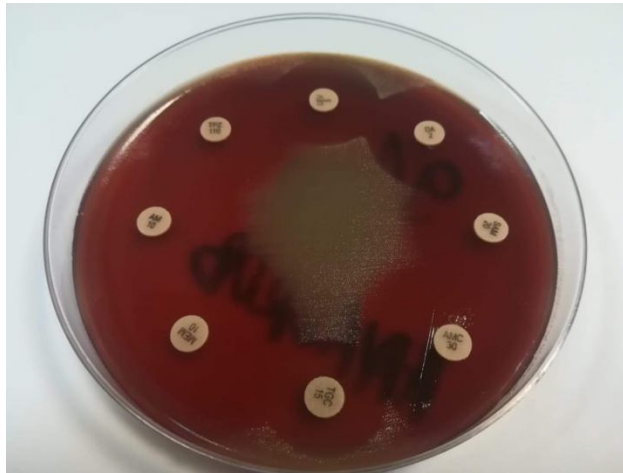


Figura 45: Bacterii anaerobe- antibiogramă

Figura 46: Bacterii anaerobe- antibiograma-test E

## 8.2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de genul *Clostridium*

**Semnificația clinică.** Infecțiile de origine exogenă produse de clostridii sunt: gangrena gazoasă, tetanosul, intoxicația botulinică și toxiinfecția alimentară cu *Cl.perfringens*.

*Cl. difficile* din flora normală a intestinului poate produce în anumite condiții infecții ale tractului digestiv, care se pot transmite și interuman. Clostridiile endogene din flora comensală pot iniția infecții grave în condiții deosebite ca, de pildă, traumatisme, intervenții chirurgicale, imunosupresie etc.

### 8.2.1. Clostridiile gangrenei gazoase

Gangrena gazoasă este o boală invazivă gravă, care se generalizează rapid, fiind dată de *Clostridium perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. falax* (germeni ubiquitari izolați din sol, apă, aer dar sunt și comensali ai intestinului). Germenii elaborează toxine care produc efecte toxice grave, generale, cu o mortalitate de 100% a cazurilor netratate și 25% a celor tratate.

**Recoltare.** Pentru izolarea clostridiilor gangrenei gazoase se recoltează secreții din profunzimea plăgii și chiar fragmente de țesuturi.

**Examenul direct** macroscopic evidențiază o secreție murdară, cu miros fetid. Examenul microscopic este foarte important pentru decizia terapeutică rapidă, deoarece gangrena gazoasă este o infecție de maximă gravitate. Caracteristică este absența de pe frotiu a oricăror elemente celulare, inclusiv a celor inflamatoare și prezența unor bacili gram pozitivi scurți și groși. Sporii lipsesc deoarece sporularea nu se produce *in vivo*.

**Izolarea** se efectuează pe mediul CDC, agar-sânge cu feni-etil-alcool și se incubează timp de 24-48 de ore la 37°C.

**Identificarea** se face pe baza caracterelor morfologice, metabolice, de patogenitate (evidențierea toxinelor) și a rezistenței la antibiotice.

**Sensibilitatea la antibiotice.** Clostridiile gangrenei gazoase sunt sensibile la penicilină G, eritromicină, ampicilină, metronidazol, cefoxitină și în mod natural rezistente la tetraciclină.

### 8.2.2. *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum*, bacil gram pozitiv, anaerob, sporulat, este agentul patogen al botulismului, o intoxicație alimentară fatală, produsă prin ingerarea de alimente ce conțin toxina botulinică: conserve de legume, pește sau carne (toxina eliberată produce gaz care bombează capacul conservei), mezeluri, șuncă (în are loc o dezvoltare caracteristică “în cuiburi”), cârnați afumați etc. Toxina ingerată rezistă la acțiunea sucului gastric, pătrunde în intestin, de unde ajunge în circulația generală pe cale limfatică și acționează asupra sistemului nervos prin blocarea eliberării de acetilcolină la nivelul sinapsei neuro-musculare. Se produce paralizia flască a musculaturii cu paralizia în final a mușchilor respiratori.

**Diagnosticul de laborator** are rolul de a confirma diagnosticul clinic și urmărește evidențierea toxinei botulinice în ser, materii fecale, conținut gastric, vărsături și mai rar a bacilului botulinic în materiile fecale.

Se recoltează sânge (ca să se obțină o cantitate de 15-25 ml de ser), 25-50 g de materii fecale sau alimentul suspect. Produsele se trimit la laboratoare de referință, deoarece laboratoarele clinice din spitale nu au posibilități de diagnostic. Un diagnostic complet precizează tipul antigenic (de la A la F) al toxinei botulinice.

### 8.2.3. *Clostridium difficile*

Este un bacil gram pozitiv, anaerob, sporulat și toxigen, agent etiologic al bolii diareice asociate antibioterapiei. Face parte din flora normală a intestinului la persoane sănătoase sau pacienți spitalizați, producând în anumite condiții, infecții ale tractului digestiv (de la simple infecții benigne, localizate, până la colite pseudomembranoase grave). Există și posibilitatea transmiterii interumane. Poate contamina mediul spitalicesc timp de mai multe luni, fiind sursă a epidemiilor nosocomiale. Factorii de risc pentru infecția cu *C.difficile* sunt: spitalizarea, tratamentele îndelungate cu antibiotice cu spectru larg, intervențiile chirurgicale pe tract digestiv, afecțiunile colonului, deficiențele imune, utilizarea de substanțe chimioterapice, vârsta de peste 65 de ani, afecțiunile renale, utilizarea inhibitorilor de pompă, etc.

Infecțiile severe cu *C. difficile* se manifestă prin diaree apoasă (cu peste 15 scaune/zi) sau scaune cu puroi și sânge, dureri abdominale, scăderea apetitului, febră, scăderea greutateii.

**Diagnosticul bacteriologic:** coprocultura se realizează din scaunul proaspăt recoltat (doar din scaun diareic), însămânțat pe medii înalt selective, de tip CCFA (cycloserine-cefoxitin-fructose-agar). Pe cultura de 48 de ore, pe mediu CCFA, coloniile sunt plate, de culoare gri, strălucitoare, cu margini de neregulate și degajă un miros tipic de gunoi de grajd. Pe medii cromogene de tip ChromID *C. difficile* agar (bioMérieux, France) coloniile sunt negre și se dezvoltă după 24 de ore de incubație. Identificarea se face pe baza caracterelor culturale, morfo – tinctoriale și miros. Confirmarea la nivel de specie se bazează pe testele biochimice, utilizându-se sistemele comerciale existente pe piață.

**Detecția citotoxinei** se realizează prin teste de citotoxicitate *in vitro* pe culturi celulare (cel mai specific) sau detecția enterotoxinei prin teste imunologice, prin teste de tip VIDAS®C. *difficile* Toxin A & B (bioMérieux), test de tip ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay). Pentru detecția colonizării, se recomandă efectuarea testelor combinate de diagnostic, care au o sensibilitate maximă.





Figura 47: Echipament identificarea *C.difficile* prin metode imunoenzimatic (Liaison)

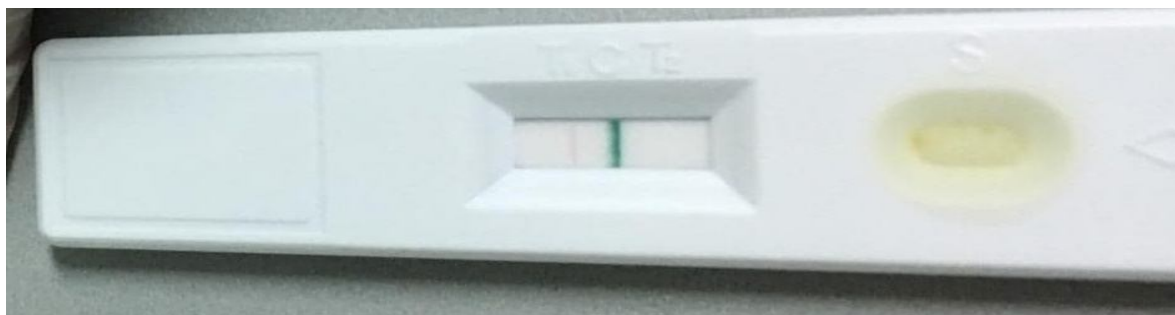


Figura 48: Test rapid pentru detectarea calitativă a antigenului *Clostridium difficile* toxin A si B,- Toxin A pozitivă

**Teste moleculare**-care au sensibilitatea cea mai mare. Se utilizează teste de tip NAAT (Nucleic acid amplification tests) de generație nouă (Cepheid Xpert *C. difficile*, BD Max Cdiff Assay, etc).



Figura 49: Identificarea *C.difficile* pe Cepheid Xpert *C. difficile*

**Sensibilitatea la antibiotice:** În infecțiile severe terapia specifică constă în administrarea de metronidazol sau vancomicina. Pentru tratarea formelor ușoare de boală întreruperea antibioterapiei este suficientă.

### 8.3. Germeni anaerobi endogeni, nesporulați

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

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

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

#### 8.3.1. Bacili gram negativi anaerobi

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

**Diagnosticul** infecțiilor produse de bacili gram negativi anaerobi constă în izolarea și identificarea lor din produsele biologice. Întrucât fac parte din flora normală a organismului, produsele contaminate cu această floră nu pot fi prelucrate. Diagnosticul este foarte laborios și implicația lor etiologică trebuie corelată cu realitățile clinice. Izolarea lor din produse normale sterile are întotdeauna semnificație patologică.

#### 8.3.2. Bacili gram pozitivi anaerobi

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

Actinomicetele sunt bacili gram pozitivi anaerobi, nesporulați care cresc sub formă de filamente. Ele fac parte din flora normală a cavității bucale de unde pot iniția, în anumite condiții infecții endogene. Specia cel mai frecvent întâlnită în patologia umană este *Actinomyces israelii*, în asociație cu alte microorganisme anaerobe ale cavității bucale (*Bacteroides* spp). Dintre infecții menționăm actinomicoza cervicofacială, toracală, abdominală, parodontită etc.

Diagnosticul este bacteriologic. Examenul microscopic direct al puroiului recoltat din abcese este de mare valoare, deoarece morfologia filamentoasă, ramificată a actinomicetelor este caracteristică. Din puroiul recoltat, care este grunjos se zdrobesc 2-3 grunji (formați prin agregarea filamentelor germenilor ramificați) între 2 lame. Lamele se despart, și fiecare se colorează Gram. Cultivarea se face pe medii complexe în condiții de anaerobioză și durează mult.

#### 8.3.3. Cocii gram pozitivi anaerobi

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

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

#### 8.3.4. Cocii gram negativi anaerobi

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

## 9. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMI DIN GENUL *MYCOBACTERIUM*

Genul *Mycobacterium* cuprinde bacili cu forme filamentoase, imobili, nesporulați, strict aerobi. Peretele celular este foarte bogat în lipide, motiv pentru care micobacteriile sunt rezistente la o serie de antiseptice și nu se colorează Gram. Mycobacteriile se colorează numai la cald, iar odată colorate, nu mai pot fi decolorate cu alcool sau acizi, de unde și denumirea de bacili alchoolo-acidorezistenți (BAAR).

**Semnificația clinică.** Din cele 41 de specii ale genului, cele mai importante din punct de vedere al patogenității sunt *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (agenții etiologici ai tuberculozei pulmonare și extrapulmonare), iar *M. leprae*, agentul etiologic al leprei. Nu trebuie neglijate alte mycobacterii ca, de pildă, *M. kansasii* și *M. avium-intracelulare* care cauzează infecții pulmonare localizate sau diseminate, ce nu se deosebesc de cele produse de *M. tuberculosis*. *M. marinum*, *M. ulcerans* produc infecții cutanate iar *M. haemophilum*, infecții cutanate dar și diseminate. *M. fortuitum* și *chelonae*, germeni cu virulență scăzută, sunt incriminați în producerea unor infecții diseminate ce interesează pielea, sistemul nervos central etc.

### 9.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Diagnosticul este bacteriologic și se realizează doar în laboratoare de referință cu nivel de biosecuritate II, III.

#### **Recoltarea** produselor patologice

-*sputa* expectorată spontan, print tuse; sputa indusă după aerosoli expectoranți; lavajul bronhoalveolar prin bronhoscopie;

-*lichidul pleural* se recoltează numai de către medic prin puncție pleurală, efectuată în mod steril și cu adăugarea de substanțe anticoagulante pentru a menține proba în stare lichidă

-*urina* se recoltează în caz de suspiciune de tuberculoză renală. Eliminarea bacililor fiind intermitentă, se recomandă ca recoltarea să se repete în decurs de câteva zile. Datorită faptului că în urină, bacilul tuberculozei este foarte expus acțiunii nocive a substanțelor eliminate (tuberculostatice, vitamina C) și a existenței unui factor bactericid specific urinei, nu se face examinarea urinei de 24 ore și nu se administrează bolnavului cu o zi înainte antibiotice și vitamina C;

-*lichidul cefalorahidian* se recoltează în scopul precizării diagnosticului de meningită tuberculoasă;

-*aspiratele de măduvă osoasă*, precum și fragmentele de chiuretaj biptic din leziunile osoase sunt examinate în cazul stabilirii diagnosticului de tuberculoză osoasă;

-*lichidul de ascită*, fragmente de peritoneu, ganglioni mezenterici etc., se recoltează prin intervenție chirurgicală, în cazul tuberculozei abdominale, peritoneale, intestinale;

-*fragmentele de ganglioni* sau chiar ganglioni întregi (axilari, cervicali, inghinali etc., în funcție de localizare) în tuberculoza ganglionară.

În cazul în care nu este posibilă prelucrarea imediată a produselor patologice, ele pot fi conservate, în bune condiții, timp de 24 de ore (cu excepția urinei) la +4°C. Pentru prevenirea uscării pieselor de biopsie se utilizează apa distilată și nu soluția fiziologică salină, care favorizează multiplicarea stafilococilor din flora asociată.

**Examenul direct.** Se efectuează pe frotiuri, colorate Ziehl-Neelsen, fie direct din produsul ca atare, fie după o prealabilă omogenizare și concentrare a acestuia, ceea ce mărește randamentul examinării. Mai frecvent se utilizează omogenizarea cu NaOH 4% (ceea ce asigură și o bună decontaminare) timp de 30 minute, la termostat la 37°C, urmată de concentrarea prin centrifugare 10-15 minute la 3.000 rotații/minut. În continuare se folosește numai sedimentul.

*Tehnica colorației Ziehl-Neelsen:*

- se acoperă frotiul uscat și fixat, cu 3-4 ml fuxină fenicată;
- se încălzește lama până la emiterea de vapori, de 3-4 ori în timp de 5 minute;
- se îndepărtează colorantul prin spălare cu apă de robinet la jet slab;
- se face decolorarea timp de două minute prin acoperirea lamei cu o soluție de acid clorhidric 3%;
- se spală lama cu apă: frotiul trebuie să rămână aproape incolor sau cel mult cu o vagă nuanță roz;
- se recolorează frotiul cu o soluție de albastru de metilen 1% timp de un minut.
- se spală bine lama și se usucă la temperatura camerei sau la termostat.

Frotiul se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie, timp de cel puțin 10 minute. Bacilii apar sub formă de bastonașe subțiri, curbați, de culoare roșie, dispuși sub formă de grămezi sau împerecheați caracteristic în unghi, rar izolați. Întrucât, prin evidențierea unor bacili nu se poate identifica specia *M. tuberculosis*, rezultatul va fi exprimat în BAAR. Un rezultat negativ se poate da numai după examinarea a minim 100 de câmpuri microscopice (în funcție de numărul bacililor vizualizați se notează BAAR +, ++, +++, etc.).

Bacilii pot fi vizualizați și prin examenul microscopic în lumină UV, utilizând tehnica de colorare la rece cu un amestec de auramină-rhodamină. Bacilii vor apărea fluorescenți pe fondul negru al preparatului.

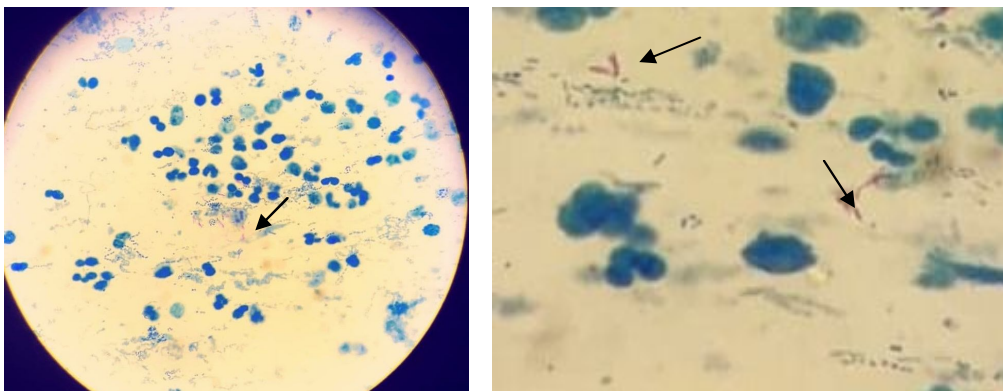


Figura 50: *M.tuberculosis* : Examen microscopic-colorație Ziehl-Nielsen

**Izolarea.** Însămânțarea produselor patologice pe medii de cultură, după o prealabilă decontaminare (tratate cu NaOH 2% care distruge flora asociată), are avantajul (față de examenul direct), că oferă un plus de rezultate pozitive și permite efectuarea unor teste biochimice de identificare precum și determinarea sensibilității germenilor față de tuberculostatice.

Pentru izolarea *M. tuberculosis* se folosesc diferite medii de cultură solide sau medii lichide pentru identificare rapidă (Bactec). Cel mai frecvent utilizat în practică este mediul Löwenstein-Jensen, livrat în eprubete, cu suprafața mediului înclinată. Cultivarea mycobacteriilor necesită condiții de biosiguranță de nivel 2.

Produsele biologice se însămânțează în câte trei eprubete cu mediu Löwenstein-Jensen, se incubează la termostat la 37°C și se urmăresc timp de 2-4 săptămâni. Multiplicarea mycobacteriilor *in vitro* fiind lentă, apariția coloniilor vizibile pe mediul de cultură survine, de regulă, după un timp de incubare de minim 14 zile.

**Identificarea.** Coloniile de *M. tuberculosis* se dezvoltă în 2-4 săptămâni și se prezintă macroscopic ca fiind proeminente, cu suprafața neregulată, de tip R (rough), conopidiforme, cu marginile neregulate, de culoare ușor gălbuie. În cazul unei creșteri abundente, coloniile confluează și devin nenumărabile. Sunt greu de emulsionat în ser fiziologic.

Coloniile de *M. bovis* se dezvoltă mai lent (4-8 săptămâni), sunt mici, netede, de tip S (smooth), cu aspect cremos, de culoare albicioasă și se emulsionează ușor în ser fiziologic. La controlul microscopic al culturilor, bacilul Koch bovin nu se deosebește de tipul uman nici tinctorial, nici morfologic.

Este posibil în prezent **diagnosticul rapid** și precis al infecțiilor cu *M. tuberculosis* prin cultivare pe medii lichide (mediul Middlebrook), folosit în sisteme automate de cultivare Bactec MGIT 960, BacT/ALERT(MB/BacT) și mai recent la noi, VersaTREK. Există și posibilitatea identificării prin teste de biologie moleculară de tip Real-time PCR TaqMan, sau prin teste rapide folosite pentru screening (pe sistem Xpert MTB/RIF).



Figura 51: *M.tuberculosis*: cultură pe mediul Lowenstein Jensen



Figura 52: Bactec™ MGIT™ 960



Figura 53: Sistem Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF

### Sensibilitatea la antibiotice

Întrucât, în fiecare populație microbială există tulpini rezistente care vor supraviețui tratamentului, în infecția tuberculoasă se administrează mai multe chimioterapice în asociație, pentru a nu permite supraviețuirea acestor tulpini.

Bacilul tuberculos este sensibil la izoniazidă (HIN), pirazinamidă (PZA), rifampicină (RMP), etambutol (EMB), streptomycină, etionamidă etc. În prezent tratamentul tuberculozei este standardizat conform unor programe naționale.

S-a constatat recent înmulțirea rapidă a tulpinilor de *M.tuberculosis* multirezistente (TB-MDR). Rezistența primară apare la indivizi care au fost infectați de novo cu tulpini MDR, iar cea secundară (dobândită) la indivizi inițial infectați cu o tulpină sensibilă, emergența mutantelor rezistente fiind un rezultat al terapiei inadecvate. TB-MDR sunt definite ca fiind tulpinile rezistente cel puțin la RMP și HIN. Indivizii infectați cu tulpini rezistente la HIN/RMP, nu vor răspunde la regimurile terapeutice de scurtă durată și vor dezvolta rezistența și la agenții apropiați PZA și EMB. Tratamentul TB-MDR este complex și de durată, cu o asocieră de 4-5 agenți de a doua linie, inclusiv fluoroquinolonele și unul din cei 3 agenți cu administrare parenterală: kanamicină, amikacină sau capreomicină. Studii recente au descris emergența tulpinilor rezistente la multiplii agenți de linia a doua, care sunt în general netratabile. Din acest motiv a fost propus termenul de tulpini de *M.tuberculosis* extensiv rezistente (TB-XDR), definite ca tulpini MDR (rezistență la cel puțin HIN și RMP), la care se asociază rezistența la fluoroquinolone și cel puțin un agent parenteral de a doua linie.

Tehnica efectuării antibiogrammei

**Principiu:** Se compară creșterea *M. tuberculosis* în sămânțat în mediul care conține substanțe anti-TB (tuburi test) cu creșterea pe tuburile de control (martor), care nu conțin aceste substanțe și se apreciază creșterea, respectiv lipsa creșterii pe tuburile test. Testarea se face pentru concentrații diferite de substanțe anti-TB, care (cel puțin teoretic), corespund concentrațiilor realizate de substanța respectivă în sângele pacienților. Rezultatele au valoare

orientativă și exprimă comportamentul *in vitro* al mycobacteriilor, cu puține dovezi referitoare la relevanța clinică a rezultatelor

Diagnostic serologic

Quantiferon TB Gold (QFT-G) și T-SPOT TB sunt teste ce măsoară valoarea interferonului imun eliberat de limfocitele activate la persoanele sensibilizate de prezența infecției.

***Intradermoreacția la tuberculină*** este utilizată ca metodă convențională pentru depistarea infecției bacilare naturale sau vaccinale, la copii.

## 10. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE BACTERII SPIRALATE

### 10.1. *Treponema pallidum*

Sifilisul este produs de *Treponema pallidum*, bacterie spiralată, mobilă, aparținând genului *Treponema*. Acest gen cuprinde numeroase specii, dintre care, o parte, cele nepatogene, se găsesc în mod normal pe mucoasa tractului respirator superior sau mucoasa genitală la om și sunt cultivabile pe medii inerte (de exemplu *Treponema phagedenis* - saprofită a mucoasei genitale). Două specii sunt înalt patogene pentru om: *Treponema carateum* și *Treponema pallidum*, aceasta din urmă fiind împărțită la rândul ei în 3 subspecii: subspecia *pallidum*, ssp. *endemicum* și ssp. *pertenue*. Ele sunt strict parazite pentru om, prezente numai la omul bolnav și necultivabile.

Singura posibilitate de a păstra în laborator treponemele patogene este inocularea intratesticulară la iepure, care va dezvolta o orhită sifilitică. În acest fel s-a păstrat în laboratoarele de referință o tulpină de *Treponema pallidum* obținută de la un pacient decedat de neurosifilis în 1912 (numita tulpina Nichols). Din această tulpină se prepară antigene de *Treponema pallidum* necesare diagnosticului serologic.

**Semnificația clinică.** *T. pallidum* ssp. *pallidum* este agentul etiologic al sifilisului venerian, transmis prin contact sexual și al sifilisului congenital transmis transplacentar de la mamă la făt. Sifilisul venerian evoluează în trei etape:

- sifilisul primar, ce apare la 15 zile de la contactul infectant și se manifestă prin apariția unui șancru, de regulă, pe mucoasa genitală,
- sifilisul secundar, care apare la 45 de zile de la apariția șancrului și se manifestă prin apariția pe tegumente și mucoase a unor leziuni - rozeole sifilitice,
- sifilisul terțiar, care apare după o perioadă de latență de 1-30 de ani și se manifestă prin leziuni distructive la nivelul SNC, aparatului circulator și în diverse organe.

**Diagnosticul de laborator.** Imposibilitatea cultivării *T. pallidum in vitro*, precum și natura tranzitorie a leziunilor, fac ca și diagnosticul să fie imposibil de realizat prin metode bacteriologice de rutină. Deși spirochetele sunt detectabile prin microscopie, în stadiile primare și secundare, diagnosticul se bazează pe simptomatologia clinică și pe testele serologice.

**Recoltarea secreției pentru examinarea la microscopul cu fond întunecat.** *Treponema pallidum* este foarte sensibilă la variațiile de temperatură, pH, presiune osmotică, umiditate și concentrația de oxigen. Din această cauză materialul recoltat trebuie examinat cât mai rapid posibil. Produsul nu poate fi păstrat la frigider sau la temperatura camerei.

Dacă sunt prezente mai multe leziuni (în sifilisul secundar) se alege cea mai tânără leziune, numărul treponemelor fiind învers proporțional cu vârsta leziunii. Leziunea se curăță cu ser fiziologic și se usucă. Dacă leziunea este ulcerată, se îndepărtează cu grijă crusta. Se scarifică ușor leziunea până când aceasta începe să sângereze ușor. Se strânge leziunea la bază și se îndepărtează primele picături de sânge. Va apare un exudat seros în șancru, pe care se aplică o lamă. Se acoperă serozitatea de pe lamă rapid cu o lamelă și se examinează imediat la microscopul cu fond întunecat.

Probele recoltate din cavitatea bucală, sau mucoasa rectală, trebuie interpretate cu rezervă, deoarece aici sunt prezente și treponeme saprofite.



Dacă examinarea directă vizează evidențierea treponemelor în țesuturi recoltate în timpul autopsiei, acestea se pot conserva prin congelare la -70°C.

**Examen microscopic:** Sifilisul primar și secundar pot fi diagnosticate rapid prin examinare la microscopul cu fond întunecat a produselor proaspete recoltate din leziuni cutanate sau mucoase. Testul este concludent, numai dacă produsul biologic conține spirochete mobile, iar preparatul este examinat de către un microbiolog cu experiență, deoarece spirochetele nu supraviețuiesc transportului la laborator, iar debrisurile tisulare pot fi confundate cu spirochetele. Examenul microscopic se aplică și diagnosticului necroptic la cei decedați de sifilis terțiar.

*Evidențierea directă a Treponemei pallidum* din secreția din șancru sau leziunile cutanate se poate efectua prin:

1. **Examen direct** al secreției din șancru, pe un preparat nativ între lamă și lamelă, la microscopul cu contrast de fază sau la un microscop cu fondul întunecat. Treponemele vor apărea strălucitoare pe fondul întunecat al preparatului, efectuând diverse mișcări de flexie, rotație, anteflexie etc. Numărul de treponeme care se găsesc în secreția din șancru depinde de stadiul leziunii. Numărul spirochetelor evidențiate poate varia între 1-50/câmp. În condițiile examinării corecte a secreției din șancru, șansele de diagnostic sunt de 95%.

2. **Efectuarea de frotiuri fixate și colorate.** Dintre metodele de colorare amintim:

- colorația Fontana - Tribondeau care are la bază impregnarea argentică și în care treponemele apar negre pe un fond galben. În general, impregnarea argentică se folosește mai puțin în diagnosticul direct al sifilisului. Ea se utilizează la colorarea preparatelor anatomo-patologice efectuate în timpul necropsiei,
- colorația Giemsa prelungită, în care spirochetele apar colorate roz pal,
- imunofluorescență cu anticorpi monoclonali marcați cu izotiocianat de fluoresceină, care este metoda cea mai specifică de examinare directă.

**Cultivarea treponemelor patogene** nu este posibilă. Ele pot fi menținute în viață *in vitro* timp de 1-6 zile de la recoltare, pe medii foarte complexe sau în culturi celulare (McCoy cu adaos de ser fetal de vițel).

Se poate practica, dar nu în mod obișnuit, boala experimentală prin inocularea materialului recoltat intratesticular la iepure care va face o orhită treponemică servind ca rezervor de treponeme.

### **Diagnostic serologic**

Cu toate că răspunsul imun în sifilis este foarte complex, diagnosticul serologic reprezintă metoda de elecție în diagnosticul sifilisului. Se efectuează în toate cele trei etape evolutive ale sifilisului. Există 2 tipuri de teste: nespecifice (cu rol de screening) și teste specifice (de confirmare), ambele cu o sensibilitate mai mică în sifilisul primar, dar având o sensibilitate de 100% în cel secundar.

Testele serologice se efectuează pe de o parte la pacienți, pentru a urmări eficacitatea tratamentului, iar pe de altă parte ca test de screening în masă, pentru depistarea noilor cazuri apărute. Legislația noastră prevede obligativitatea efectuării unui test serologic de depistare (screening) a sifilisului (prin test VDRL) la căsătorie, angajare, examene de admitere, la obținerea permisului de conducere auto, la gravide etc.

Pentru mai buna înțelegere a diagnosticului serologic, este necesară cunoașterea structurii antigenice a treponemelor:

- *antigenul ubiquitar cardiolipinic* care este prezent la toate treponemele (comensale și patogene) dar și la alte bacterii, unele plante și țesuturi (cordul de bou). Acest antigen determină în organism formarea de *anticorpi antilipoidici* (denumiți în trecut reagine) sau anticorpi Wassermann, care se evidențiază printr-o reacție de fixare a complementului (RFC) de tipul

reacției Bordet Wassermann (RBW) și prin reacții de floculare, de tip Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) și Rapid Plasma Reagin (RPR) Aceste reacții folosesc antigen cardiolipinic extras din cordul de bou.

- *antigenul proteic Reiter* cu specificitate de gen *Treponema*. Toate speciile de treponeme, indiferent de patogenitatea lor, au acest antigen care va determina apariția de *anticorpi antiproteici*. Aceștia se evidențiază tot prin RFC, dar ca antigen se folosește antigenul proteic Reiter. Acesta se extrage dintr-o tulpină cultivabilă de *Treponema phagedenis* (comensală a mucoasei genitale), denumită tulpina Reiter. Reacțiile (RPCF- Reiter protein complement fixation sau KRP- Kolmer Reiter protein) au un grad de specificitate mai înalt decât reacția RPR sau reacțiile de floculare.
- *antigene specifice* prezente doar la treponemele patogene. Anticorpii ce se formează în organism față de aceste antigene, cum sunt *anticorpii antiproteici*, *antipolizaharidici* și *imobilizinele*, se evidențiază prin mai multe reacții serologice, strict specifice pentru *Treponema pallidum*.

### 1. Testele nespecifice (netreponemice)

Măsoară anticorpii Ig G și Ig M (numiți și reagine) formați împotriva lipidelor eliberate din celulele lezate în cursul primului stadiu al bolii și prezente pe suprafața treponemelor. Antigenul utilizat pentru aceste teste este cardiolipinul. Cele mai utilizate teste sunt **VDRL și RPR**. Ambele măsoară flocularea cardiolipinului în prezenta anticorpilor din serul pacientului, sunt rapide și se pozitivează precoce. Determinarea calitativă a acestor anticorpi se utilizează ca teste screening, pentru depistarea în masă a cazurilor de sifilis, iar cea cantitativă în urmărirea eficacității tratamentului. Testele netreponemice se pozitivează la 4-6 săptămâni după infecție, adică la 1-2 săptămâni de la apariția șancrului. Titrurile cresc în timpul perioadei secundare, pentru a descrește încet în perioada de latență și în sifilisul terțiar. Tratamentul precoce al sifilisului împiedică apariția acestor anticorpi. Tratamentul sifilisului primar și secundar duce la scăderea rapidă a titrului de anticorpi cu negativare, în cele mai multe cazuri, în 6-18 luni. Fiind nespecifice, testele treponemice pot da reacții fals pozitive. Numai VDRL-ul poate fi utilizat pentru testarea LCR la pacienții suspecți de neurosifilis.

Reacții fals pozitive pot apare în: boli acute febrile, vaccinare recentă, sarcină, boli autoimune sau de colagen, infecții hepatice cu distrucție tisulară, pacienți în vârstă.

Testele non-treponemice sunt rapide, ușor de efectuat, au un cost redus și prezintă o sensibilitate foarte bună, în special în stadiul precoce al infecției. Principalul lor dezavantaj este că se asociază cu o rată importantă de rezultate fals pozitive, în special la gravide. Rezultatele pot fi exprimate calitativ sau semicantitativ, titrurile VDRL/RPR fiind crescute la pacienții cu infecție acută, reinfecție sau reactivare a unei infecții din antecedente, care nu a fost tratată adecvat.

### 2. Testele specifice (treponemice)

Detectează anticorpi specifici față de antigenele treponemice. Antigenele utilizate în cadrul acestor teste, provin de la spirochetele izolate din leziuni testiculare ale iepurelui. Sunt utilizate pentru confirmarea rezultatelor pozitive ale VDRL sau RPR. Testele specifice pot fi pozitive înaintea celor nespecifice, sau pot rămâne pozitive la pacienții cu sifilis terțiar, la care testele nespecifice s-au negativat. Se efectuează de asemenea persoanelor cu serologie negativă la testele netreponemice, dar cu elemente epidemiologice și clinice ce pledează pentru sifilis. Testele treponemice nu au valoare în aprecierea eficacității tratamentului sau în stabilirea

prognosticului, deci efectuarea lor cantitativă nu este motivată. Testele treponemice se mențin pozitive ani de zile, fiind deseori unicele teste pozitive în sifilisul terțiar.

Cele mai utilizate teste specifice sunt:

2.1. **Testul de imobilizare a treponemelor (TIT):** pune în evidență anticorpii imobilizanți ai treponemelor. Testul se efectuează utilizând o suspensie de treponeme patogene vii, din tulpina Nichols, care se pune în contact cu serul de cercetat. Se efectuează un preparat între lamă și lamelă, care se examinează la microscopul cu contrast de fază sau cu fondul întunecat. Treponemele apar albe strălucitoare, la început mobile. Dacă ele își încetinesc mișcările, iar apoi se imobilizează, reacția este pozitivă.

2.2. **Testul FTA-ABS (fluorescent antibody absorbtion):** se pun în contact treponeme (tulpina Nichols) cu serul de cercetat. În această fază, dacă în serul respectiv există anticorpi antitreponema, ei se vor fixa de treponeme. Se adaugă anticorpi fluorescenți - antiimunoglobulină umană care se vor fixa de anticorpii fixați anterior de tulpina Nichols. Examinarea la microscopul cu lumină UV a preparatului va evidenția treponemele fluorescente.

2.3. **Testul de hemaglutinare pasivă (TPHA):** folosește hematii, care au adsorbite pe suprafața lor antigene treponemice extrase din tulpina Nichols. Ele se pun în contact cu serul de cercetat care, dacă conține anticorpi, va aglutina hematiile respective. Acest test este mai simplu din punct de vedere tehnic și mai ușor de interpretat decât FTA-ABS.

2.4. **Testul EIA:** folosește antigene treponemice recombinante în plăci cu godeuri pentru a detecta anticorpii Ig M și Ig G produși de către organism. Are o sensibilitate similară testelor non-treponemice și o specificitate echivalentă testelor TPHA și FTA-ABS. Din aceste motive, testele EIA pot reprezenta o alternativă eficientă la asocierea tradițională a testelor non-treponemice și treponemice pentru diagnosticul definitiv al sifilisului. Testele EIA IgM sunt mai sensibile decât FTA-ABS IgM și pot fi folosite pentru diagnosticul sifilisului precoce sau congenital

2.5. **Testul Western Blot IgM.** Acest test detectează anticorpii față de câteva antigene treponemice imunodominante, combinând electroforeza cu o reacție cu anticorpi marcați cu enzime. Testele teponemice sunt folosite pentru a confirma testele screening pozitive. Au o incidență de rezultate fals pozitive mai scăzută decât testele reaginice. Nu sunt în general recomandate pentru screening-ul infecției, deoarece au o sensibilitate mai redusă decât testele non-treponemice în primele 2-3 săptămâni ale stadiului de sifilis primar. Acest tip de anticorpi persistă toată viața; nu sunt utili în monitorizarea eficienței terapeutice.

Specificitatea testelor treponemice este de 97-99%. Multe dintre reacțiile fals pozitive sunt recunoscute prin tehnica Western Blot cu antigen *T. pallidum* integral. Deși rezultatele testelor treponemice rămân în general pozitive toată viața la un pacient cu sifilis, un test negativ nu e semnificativ la pacienții cu SIDA (tabel 5).

Tabel 5: Răspunsul imunologic în sifilis

VDRL	TPHA	Diagnostic	Examene complementare
-	-	Diagnostic negativ (cu excepția unei contaminări recente)	FTA și depistarea IgM sau se reface serologia peste 15 zile.
+	+	Diagnostic pozitiv (prezumtiv)	Serologie cantitativă și anamneză pentru stabilirea stadiului. În caz de dubii, evidențierea IgM specifice și TPI: -IgM+și TPI - = sifilis primar -IgM+și TPI + = sifilis secundar -IgM- și TPI + = sifilis latent
-	+	Sifilis recent tratat sau mai vechi (tratată sau netratată)	Serologie cantitativă, anamneză și eventual alte reacții serologice pentru a preciza indicația de tratament.
+	-	TPHA - trebuie confirmat printr-o altă reacție (FTA)	Dacă această reacție este negativă, este vorba despre un VDRL fals pozitiv.

Reacții serologice pozitive la nou-născuții din mame infectate pot reprezenta un transfer pasiv de anticorpi sau un răspuns imun specific la infecție. Diferențierea acestor 2 situații se face prin titrarea în dinamică a anticorpilor nou-născuților, într-un interval de 6 luni. Titrul anticorpilor unui nou-născut neinfestat scade până la nivele nedecelabile, în 3 luni după naștere, dar rămâne crescut la nou-născuții cu sifilis congenital. Depistarea anticorpilor specifici de clasa Ig M în serul nou-născuților semnifică de asemeni sifilis congenital.

**Metode ale biologiei moleculare**-utilizează reacția de amplificare genică, PCR.

#### Sensibilitate la antibiotice

Antibioticul de elecție pentru tratamentul sifilisului este penicilina. Nu s-a constatat secreția de  $\beta$ -lactamază la tulpinile de *T. pallidum*.

În cazul sifilisului primar și secundar, se preferă administrarea de benzatin-penicilină (**penicilină retard**). În cazuri de sifilis terțiar și congenital se utilizează **penicilina G**. La pacienții alergici la penicilină, se administrează doxiciclina sau tetraciclina, întrucât s-au constatat eșecuri în terapia cu eritromicină, datorită existenței de tulpini rezistente.

În cazul tratamentului intempestiv cu penicilină a sifilisului generalizat, poate apărea reacția Jarisch-Herxheimer, urmare a distrucției rapide a unui număr crescut de treponeme și a eliberării de endotoxine în circulație. Se deosebește de o reacție anafilactică prin prezența febrei.

Profilaxia este nespecifică și constă în practicarea sexului protejat, depistarea și tratarea partenerilor sexuali ai pacienților cu infecție diagnosticată. Pentru prevenirea sifilisului congenital se recomandă testarea serologică obligatorie a tuturor femeilor gravide în primele luni de sarcină.

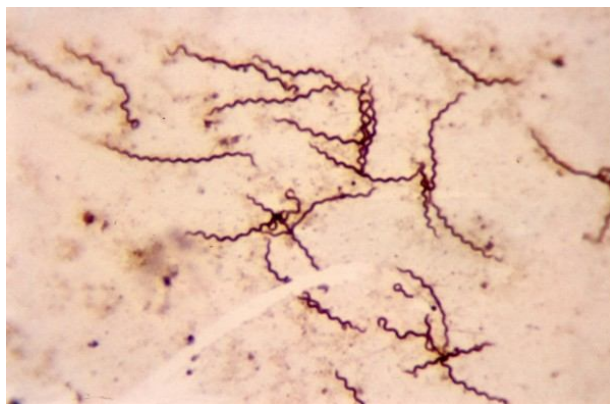


Figura 54: *T. palidum* - examen microscopic, colorație Fontana-Tribondeau

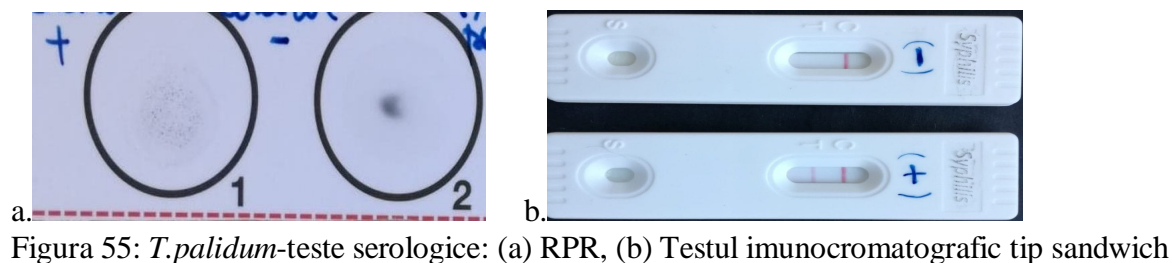


Figura 55: *T. palidum*-teste serologice: (a) RPR, (b) Testul imunocromatografic tip sandwich

## 10.2. *Borrelia*

Spirochetele genului *Borrelia* aparțin familiei *Spirochaetaceae* din cadrul ordinului *Spirochaetales*. Sunt bacterii gram negative, spiralate (formate din 3-20 de spire largi), groase (0,2-0,5/3-20 $\mu$ m), mobile (prezintă mișcări de flexie, rotație și înșurubare datorita unui număr de 15-20 de flageli periplasmatici), necapsulate, nesporulate, pretențioase nutritiv, cu creștere lentă, anaerobe sau microaerofile.

**Semnificația clinică.** Speciile genului *Borrelia* sunt responsabile pentru producerea a două boli umane importante: **febra recurentă** și **boala Lyme**.

**Febra recurentă epidemică** (europeană) este determinată de *Borrelia recurrentis*, specie ce se transmite interpersonal la om prin păduchele uman, *Pediculus*. *Borrelia recurrentis* parazitează omul și păduchii. La păduchi, boreliile se multiplică în lichidul celomic.

Poarta de intrare a infecției la om o reprezintă leziunile de grataj sau conjunctiva, contaminate cu lichidul celomic eliberat prin strivirea insectei infectate peste locul mușcăturii.

**Febrele recurente endemice** (descrise în alte zone geografice) sunt determinate de 15 specii de *Borrelia* transmise de căpușe din genul *Ornithodoros* (la care spirocheta se transmite transovarian, ceea ce reprezintă o cauză de întreținere a infecției în natură). Căpușele parazitează extrem de rar omul. Sursa de infecție este reprezentată de rozătoare sălbatice sau peridomestice.

Simptomele clinice ale celor două tipuri de febre recurente sunt, în esență, asemănătoare. După o perioadă de incubație de 2-15 zile, boala debutează brusc cu accese febrile (40-41°C) pe durata a 5-7 zile, urmate de perioade afebrile de 3-10 zile. Aceste accese se repetă de 3-5 ori (recăderi).

*Borrelia burgdorferi* este agentul etiologic al **bolii Lyme** (maladia erithema migrans), denumita după localitatea Lyme, Connecticut, SUA, unde a fost observată pentru prima oară în 1976), dar relativ frecventă și în Europa. Specia este găzduită de variate păsări sălbatice și

mamifere (cai, câini), iar transmiterea se face prin căpușe *Ixodidae* (*Ixodes dammini* în nord-estul și vestul SUA, *Ixodes pacificus* în vestul SUA și *Ixodes ricinus* în Europa) și, probabil, și prin țânțari. Simptomatologia clinică apare după o perioadă de incubație de 1-3 săptămâni de la înțepătura infectantă și evoluează, frecvent, în trei stadii.

*Primul stadiu* (stadiul precoce) este dominat de leziuni cutanate (eritem migrator care apare în jurul mușcăturii de căpușă și se extinde centrifug, limfadenoză cutanată) pe un fond febril la care se adaugă simptome generale necaracteristice (cefalee, artralgii, dureri gastro-intestinale)

*Al doilea stadiu* poate apare după săptămâni sau luni de zile din momentul infectării, prin diseminarea generală a spirochetelor. Se caracterizează prin miocardită, vasculită, artrită, adenopatii limfatice și simptome neurologice.

*Al treilea stadiu* este dominat de artrite cronice recidivante (artrita Lyme), în special la articulațiile mari: genunchi, cot, extremități, putând dura până la 10-15 ani și acrodermatită cronică atrofică.

### **Diagnosticul bacteriologic**

**Examen microscopic:** Este cea mai sensibilă metodă de diagnostic a febrei recurente. Borreliile pot fi observate în cursul episodului febril, pe frotiu de sânge periferic, colorat Giemsa sau Wright, ori pe preparat umed din sânge, examinat la microscopul cu fond întunecat.

**Examinarea directă.** În cadrul **febrelor recurente** se urmărește:

- examinarea rapidă și detectarea la microscopul cu fond întunecat a spirochetelor în sângele periferic al pacienților, în perioadele acceselor febrile, în preparate native (umede) între lamă și lamelă, frotiu subțire sau în picătură groasă de sânge (o picătură de sânge periferic omogenizat într-o picătură de citrat de sodiu),
- examinarea frotiurilor sanguine colorate Giemsa, Wright, Leishman sau May-Grünwald, deoarece boreliile au o afinitate pentru coloranții acizi și se colorează cu aproape toți coloranții de anilină, la microscopul cu fond luminos.

În preparate native, se pun în evidență microorganisme mari, spiralate, cu 4-30 de spire largi și foarte regulate, lungimea de 5-25 μm și grosimea de 0,2- 0,5 μm, cu capetele efilate (mai lungi decât la *Treponema* și *Leptospira*), foarte mobile, cu mișcări de flexie, rotație, înșurubare.

În **boala Lyme** sedimentul din LCR și frotiul sanguin se examinează în colorație cu acridin orange, Giemsa, sau în imunofluorescență directă. Din cauza numărului scăzut de borelii din produsele patologice, microscopia nu este însă relevantă.

**Detectarea spirochetelor în artropodele vectoare.** În corpul păduchilor spirochetele pot fi puse în evidență prin, examinarea microscopică a hemolimfei obținută prin amputarea porțiunii distale a unuia sau a mai multor membre.

**Izolarea:** se poate realiza *in vivo*, în special pe artropodele vectoare specifice sau pe gazde vertebrate (rozătoarele mici), precum și pe ouă embrionate. *In vitro*, s-a reușit cultivarea *B. recurrentis* pe medii complexe (mediul Kelly cu conținut albumină bovină, și pe mediul Dodge cu conținut de bulion tripticase soia), iar *B. burgdorferi* pe o versiune modificată a mediului Kelly. Boreliile cresc în microaerofilie la pH 7,2, și la temperatura optimă de 28-30°C.

**Diagnosticul serologic.** În cazul febrelor recurente, structura antigenică a boreliilor implicate în etiologia acestora se particularizează prin variabilitate (se înregistrează frecvente mutații antigenice în timpul aceleiași infecții, dată de o unică tulpină). În fiecare din puseele febrile se pot izola alte variante, ceea ce face ca valoarea testelor serologice să fie redusă. Fiecare variantă antigenică va fi eliminată de anticorpii specifici bactericizi prin borelioliză, acești anticorpi selectând varianta antigenică responsabilă de următorul acces febril. Variația se face probabil către un tip antigenic unic. După vindecare, imunitatea persistă aproximativ un an.

În cazul bolii Lyme, testele serologice sunt foarte importante pentru confirmarea diagnosticului clinic și detectează anticorpii specifici anti-*Borrelia* de tip Ig.M și Ig.G și sunt cele mai folosite teste în diagnosticul bolii Lyme.

Pentru a crește acuratețea rezultatelor serologice, CDC (Centers for Disease Prevention and Control) a propus încă din 1994 un algoritm de diagnostic compus din două etape :

- **În prima etapă se folosește un test EIA (Enzyme Immunoassay) sau IFA** (immunofluorescence assay), care au o sensibilitate crescută, ceea ce conferă siguranța că la un rezultat negativ probabilitatea ca acea persoană să aibă boala este foarte mică.

La pacienții suspecți de boala Lyme în faza inițială a bolii cu serologie negativă, evidențierea infecției se poate obține prin testarea serurilor pereche din perioada acută și de convalescență a bolii. Dacă rezultatul acestei etape este pozitiv sau echivoc, se continuă cu etapa a doua, pentru confirmarea rezultatului.

- **Etapa a doua constă în efectuarea testului Western Blot**, care are o specificitate mare, ceea ce înseamnă că va fi pozitiv doar la persoanele care sunt într-adevăr infectate.

În cazul în care rezultatul este negativ, dar există suspiciune de boală (recoltarea s-a efectuat timpuriu), se recomandă repetarea recoltării după câteva săptămâni.

Pentru diagnosticul neuroboreliozei se recomandă detecția producerii intratecale de anticorpi anti *Borrelia*. Acest lucru se realizează prin testarea unor probe pereche de LCR și ser obținute prin recoltare în aceeași zi. Prezența unui titru de anticorpi mai mare în LCR decât în ser se stabilește calculând un index, care certifică diagnosticul de neuroborelioză.

Se mai pot folosi reacții serologice de tip RFC și Imunofluorescență.

Tabel 6: Sensibilitatea metodei Western Blot în detectarea anticorpilor de tip IgM și IgG în funcție de stadiul bolii:

STADIUL BOLII	SENSIBILITATE	ANTICORPI
<b>I</b>	20-50 %	Predomină IgM
<b>II</b>	70-90 %	Prezente ambele clase Ig M și Ig G
<b>III</b>	90-100 %	Frecvent doar IgG

#### **Limitele și interferențele testelor serologice:**

Rezultate fals negative pot fi obținute când testarea se efectuează la debutul bolii, în cursul antibioterapiei administrate în primul stadiu al infecției, la persoane imunodeprimite și la femei însărcinate.

Rezultate fals pozitive pot fi obținute la pacienții cu alte boli produse de spirochete (sifilis, febra recurentă, leptospiroza) sau boli autoimune.

Diagnosticul bolii Lyme rămâne o provocare în cazurile ambigue clinic, cu serologie echivoca și PCR negativ, situație în care se poate folosi **Testul de transformare limfoblastică (LTT)** : care se bazează pe principiul diviziunii celulare limfocitare induse de contactul cu antigenul “specific”.

**Tehnicile moleculare** se bazează pe amplificarea unei regiuni specifice a genomului bacterian. Au o sensibilitate mai mare decât cultura în cazul prelevatelor bioptice, a sângelui și a lichidului articular.

**Sensibilitatea la antibiotice.** În cazul febrei recurente doxiciclina este antibioticul de elecție, dar este contraindicată la femeile gravide și copii mici. În cazul contraindicațiilor, se poate folosi eritromicina.

În cazul bolii Lyme în stadii incipiente ale bolii, se poate administra doxiciclina sau amoxicilina, iar în stadii tardive, ceftriaxona.

Rezultatul terapeutic este spectaculos cu condiția să fie instituit într-un stadiu precoce. În faza terțiară, artropatia și semnele neuroase odată instalate, regresează mult mai lent sau chiar deloc.

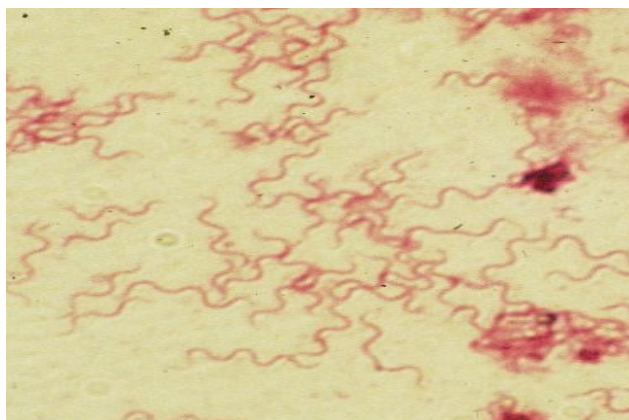
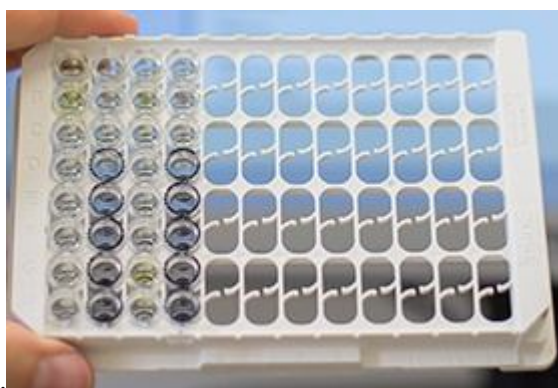


Figura 56: *Borrelia burgdorferi* - examen microscopic, colorație Fontana-Tribondeau



a.

b.

C. ViraChip IgM MIB Microtiter Wells



D. ViraChip IgG MIB Microtiter Wells

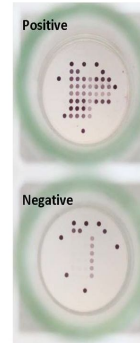


Figura 57: *Borrelia burgdorferi* - teste serologice (a) ELISA, (b) Testul Western Blot



## 11. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE MICOPLASME

Micoplasmele constituie un grup particular de bacterii, încadrate în clasa Mollicutes, familia *Mycoplasmataceae*. Această familie cuprinde 69 de specii de *Mycoplasma* și 2 specii de *Ureaplasma*. Sunt bacterii ubiquitare izolate la om, animale, păsări, insecte, plante, sol, ape de canal etc.

**Semnificația clinică.** Infecțiile provocate de micoplasme sunt asimptomatice în 30-70% din cazuri. Sunt cunoscute 3 specii.

*Mycoplasma pneumoniae* este cauza majoră a unei pneumonii atipice primare și nu face parte din flora normală a omului. Ea persistă câteva luni în tractul respirator după infecție.

*Mycoplasma hominis* și *Ureaplasma urealyticum* sunt implicate într-o multitudine de afecțiuni urogenitale: boala inflamatorie pelvină, sterilitate, avort septic, uretrite nongonococice la bărbați, rar orhiepididimite, sindrom uretral la femei, infecții puerperale acute (subacute și cronice), pielonefrite, peritonite, sindrom Reiter. Anumite serotipuri sunt implicate în etiopatogenia infertilității. Transmiterea se poate face prin contact direct între gazde, vertical de la mamă la făt, prin infecții nosocomiale și prin transplant.

Acești agenți colonizează vaginul femeilor care au contact cu mai mulți parteneri. Clinic se manifestă ca: vaginite, cervicite, bartholinite, febră puerperală și chiar sterilitate. La bărbat *Ureaplasma urealyticum* produce rar uretrite și prostatite și la ambele sexe infecții urinare.

**Diagnosticul de laborator** se bazează pe izolarea și identificarea micoplasmelor din produsul biologic și evidențierea în dinamică a titrului de anticorpi specifici în serul de cercetat.

**Recoltarea și transportul produselor patologice.** În funcție de localizarea infecției se recoltează exudat faringian, spută, secreție nazală, secreție vaginală, uretrală, urină etc. Recoltarea se efectuează respectând cu strictețe normele de sterilitate și se recomandă, ca însămânțarea produsului să se facă imediat după recoltare. În cazul în care însămânțarea imediată nu este posibilă, se vor folosi medii de transport complexe.

Când se urmărește izolarea tulpinilor de *Ureaplasma urealyticum* din secreții vaginale și uretrale se folosesc tampoane de dacron, alginat sau poliester pentru a nu inhiba microorganismele, care se mențin într-un mediu special.

**Examenul microscopic direct** din produsul patologic se face doar dacă există posibilitatea de a evidenția micoplasmele prin IF cu anticorpi monoclonali antimicoplasma.

**Izolarea.** Însămânțarea produselor se face pe medii speciale pentru micoplasme, lichide, solide sau difazice. Cultivarea lor necesită medii complexe, anumite condiții de temperatură, pH și umiditate. Mediile trebuie să conțină un mediu de bază - bulionul Martin la care se adaugă extract de drojdie, ser sanguin, factori selectivi (penicilină, albastru de metilen) și uree pentru *U. urealyticum*.

**Identificarea. Caractere culturale.** Pe mediile lichide micoplasmele nu produc în general turbiditatea acestora, decât dacă creșterea este foarte abundentă. Culturile pe medii solide se examinează la intervale de 2-3 zile, pe o perioadă de 2-3 săptămâni, la microscopul cu lumină oblică, datorită dimensiunilor extrem de mici ale coloniilor (fiind cuprinse între 10-20 μm și 600 μm). Coloniile sunt rotunde, prezentând un centru dens înconjurat de o zonă mai clară. Acest aspect de "ochi de ou" este caracteristic micoplasmelor. Micoplasmele se pot cultiva și pe culturi celulare sau pe ouă embrionate.

După examinarea la microscop a coloniilor, se efectuează frotiuri colorate Giemsa, deoarece micoplasmele sunt foarte slab gram negative. Datorită absenței peretelui celular, forma micoplasmelor este variată și depinde de condițiile de cultivare. Se disting forme cocoide,

filamentoase, filamentoase cu structuri terminale, în formă de pară cu structuri terminale și stelate. Tulpinile T nu au o morfologie caracteristică.

**Identificarea speciilor de micoplasme.** Examenul morfologic nu permite identificarea lor. O orientare ne-o oferă creșterea micoplasmelor pe medii lichide care, prin modificarea culorii, pun în evidență anumite caractere metabolice ca de pildă, metabolizarea glucozei (*M. pneumoniae*), argininei (*M. hominis*), hidroliza ureei (*Ureaplasma urealyticum*). *M. pneumoniae* reduce albastrul de metilen, caracter specific speciei.

Există pe piață kituri de identificare și testarea sensibilitatii la antibiotice a tulpinilor de *Mycoplasma hominis* și *Ureaplasma urealyticum*, care combină cultura în bulion selectiv cu un strip cu 22 teste. Bulionul furnizează condiții optime de creștere (pH, substrat nutritiv, factori de creștere). Dacă cultura în bulion este pozitivă, atunci substraturile specifice (uree pentru *Ureaplasma* spp și arginina pentru *M. hominis*) și indicatorul de culoare roșu fenol prezente în bulion vor conduce la schimbarea culorii, ca urmare a creșterii pH-ului.

După inoculare, bulionul este dispersat în strip, iar citirea se face la 24 ore și la 48 ore. Acesta furnizează simultan rezultate pentru identificare, apreciere semicantitativă și testarea susceptibilității la 9 antibiotice (Doxiciclina, Josamicina, Ofloxacina, Eritromicina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Azitromicina, Claritromicina, Pristinamicina).

Pentru identificarea rapidă a *M. pneumoniae*, direct din produsele patologice, s-a introdus tehnica PCR. Sensibilitatea testului este crescută la spută, dar nu și la exudatul faringian.

**Diagnosticul serologic** se practică numai în infecțiile cu *M. pneumoniae*.

- reacția de fixare a complementului evidențiază IgG, care atinge un titru maxim la 4 săptămâni de la debutul infecției și persistă 6-12 luni. Titrul trebuie să fie peste 1/32. Dezavantajul acestei reacții este specificitatea redusă și riscul unor reacții fals pozitive,
- reacția Elisa - s-a dovedit mai sensibilă și specifică. Prin această reacție se evidențiază IgM, a căror prezență și titrul ridicat indică o infecție acută,
- evidențierea aglutininelor “la rece” este o reacție nespecifică, accesibilă oricărui laborator. Se bazează pe faptul că la temperatura de 4°C, IgM din serul pacientului se leagă de suprafața hematiilor și le aglutinează.

**Sensibilitatea la antibiotice:** Tratamentul se face cu tetraciclina sau eritromicina, dar antibioticul de elecție este claritromicina. *Ureaplasma urealyticum* este rezistentă la tetraciclina, iar *M. hominis* este rezistentă la eritromicina, iar uneori la tetraciclina. Doxiciclina are o eficiență slabă în tratamentul microbiologic, în timp ce azitromicina administrată în doză unică are o rată de vindecare crescută. Datorită lipsei peretelui celular, aceste bacterii prezintă rezistență la antibioticele care acționează la acest nivel. Noile macrolide și quinolone sunt utilizate mai frecvent în acest moment : Azitromicina 500mg ca primă doză (ziua 1) apoi 250 mg în ziua 2 și 5; Moxifloxacin 400 mg pe zi 7 – 10 zile.



Figura 58: Kit de identificare *Micoplasma*

## 12. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Chlamydiile sunt bacterii cu parazitism obligatoriu intracelular, cu un perete celular și ribozomi similare cu cele ale organismelor gram-negative, care au un ciclu de multiplicare unic în lumea bacteriilor. Absența peptidoglicanului explică de ce organismul nu este văzut prin colorația standard Gram și de ce beta-lactaminele nu sunt eficiente pentru tratament.

Genul *Chlamydia* include trei specii care infectează gazda umana: *C. trachomatis*, *C. psittaci* și *C. pneumoniae*. *C. trachomatis*. *Chlamydia* este responsabilă de cea mai frecventă infecție cu transmitere sexuală bacteriană. Multe persoane care prezintă infecție cu chlamydia pot avea simptomatologie minimă sau pot fi asimptomatice.

Ciclul lor de viață este complex și cuprinde corpuculul elementar și corpuscul reticulat.

Infecțiile produse de *Chlamydia* sunt:

Infecții genitale: uretrită, epididimită (la bărbați), cervicită, uretrită, sindrom inflamator pelvin, perihepatită (Sindrom Fitz-Hugh-Curtis) (la femei)

Alte infecții la bărbați și femei: conjunctivite, infecții oro-faringiene, rectite-colite, Limfogranulomatoză veneriană, artrite (Sindromul Reiter), infecții la nou născuți și copii, conjunctivite, trachom, uretrite, pneumonii.

**Recoltarea produselor** patologice în vederea evidențierii *Chlamydiei trachomatis* se realizează în cabinetele de ginecologie și urologie, de către un personal instruit. Produsele recoltate sunt în funcție de infecție.

*Recoltarea secreției cervicale.* Cu ajutorul unui specul vaginal, sau a unor depărtătoare se îndepărtează pereții vaginali pentru vizualizarea colului uterin. Se îndepărtează mucusul din colul uterin cu ajutorul unui tampon, după care se inseră ferm un alt tampon sau periute endocervicale în col și se rotește de câteva ori la 360° pentru a obține un număr mai mare de celule epiteliale endocervicale.

*Recoltarea secreției uretrale* se face cu un tampon subțire, care se introduce 1-2 cm în uretră și se rotește timp de câteva secunde. În infecțiile uretrale la bărbat, chlamydiile sunt prezente constant în sedimentul primului jet din urina de dimineață. Evidențierea chlamydiilor din acest produs constituie un screening pentru depistarea infecției chlamydiene la bărbații asimptomatici.

*Recoltarea secreției rectale* se efectuează prin introducerea unui tampon în canalul anal la 3 cm, urmată de ștergerea temeinică a criptelor. Dacă tamponul este contaminat cu materii fecale, se aruncă și recoltarea se repetă.

*Recoltarea secreției oculare* în conjunctivitele cu incluzii și trachom se efectuează cu tamponane fine, prin ștergerea suprafeței interne a mucoasei pleoapei inferioare, după o prealabilă anestezie cu procaină.

În limfogranulomatoza veneriană se recoltează aspirat din bubon. În psitacoză se recoltează spută, sânge sau material biptic din splină, ficat etc.

**Cultivarea chlamydiilor.** Izolarea chlamydiilor pe ouă embrionate se utilizează astăzi pentru producția de antigene concentrate, destinate testelor serologice (nu este utilizată în diagnostic).

Pentru o lungă perioadă de timp, cultura celulară a constituit metoda de referință în diagnosticul de laborator al infecției chlamydiene. Metoda fiind însă foarte scumpă și laborioasă, au fost introduse teste cu rezultate comparabile, de tipul detectării imunoenzimatică a antigenului *Chlamydia*.

**Evidențierea antigenică.** Metodele de evidențiere antigenică a chlamydiilor au fost puse la punct în ultimii 15 ani. Ele se bazează fie pe vizualizarea directă a chlamydiilor cu anticorpi

monoclonali fluorescenți, fie pe evidențierea imunochimică a componentelor chlamydiene solubilizate. Antigenul Chlamydia este extras din probele recoltate din endocolul uterin (la femei), uretră sau din primul jet de urina (la bărbați). El poate fi detectat în mai puțin de trei ore.

*Imunofluorescența directă* (IF) este un test rapid, recomandat laboratoarelor de rutină. Avantajul major al IF este specificitatea, sensibilitatea și rapiditatea testului (1/2h). În principiu metoda constă în colorarea frotiurilor destinate diagnosticului cu anticorpi monoclonali antichlamydia și examinarea lor la microscopul cu lumină UV. Corpusculii elementari au aspectul unor formațiuni rotunde cu fluorescență galben verzuie.

*Teste imunoenzimatiche Elisa* de evidențiere a *C.trachomatis*. Numărul acestor teste a crescut rapid, de remarcat: metodele Chlamydiazyme (firma Abbott - SUA), Ideia ( firma Boots-Celltech Slough - Anglia) și AntigEnz Chlamydia Enzyme (firma Baxter/Bartels - SUA). Avantajul acestor teste este eludarea subiectivismului interpretării reacției prin citirea spectrofotometrică a rezultatelor. Tehnicile Elisa sunt aplicabile acolo unde numărul probelor este mare.

*Testele imunoenzimatiche în fază solidă* au apărut ca urmare a necesității introducerii în practică a unor tehnici foarte simple și rapide, care să permită medicului practician, indiferent de specialitate, un diagnostic rapid în cabinetele de consultație: truse Test Pack Chlamydia (Abbot), Clearview Chlamydia (Unipath-UK) etc. Aceste metode, prezintă o serie de avantaje. Sunt metode simple care, prin faptul că nu necesită aparatură și nici personal calificat, introduc diagnosticul infecțiilor chlamydiene în cabinetele de ginecologie, urologie etc.

**Evidențierea acizilor nucleici.** Amplificarea secvențelor de acid nucleic (fie ADN sau ARN) sunt specifice pentru detectarea organismului. La bărbați, este testul cel mai sensibil și recomandat pentru detectarea *C. trachomatis* dintr-un tampon uretral sau primul jet urinar. Pentru screening-ul la femei, tampoanele vaginale sunt preferate față de probele de urină.

**Diagnosticul serologic.** Testarea serologică este rareori utilizată, pentru diagnosticul infecțiilor genitale necomplicate cauzate de *C. trachomatis*, deoarece nu fac distincția dintre infecția acută și cea cronică. Două tipuri principale de teste serologice sunt folosite pentru diagnosticare: RFC, (care măsoară titrul anticorpilor împotriva antigenului lipopolizaharidic specific de grup) și microimunofluorescență. Dinamica anumitor tipuri de anticorpi poate indica stadiul infecției. Testarea anticorpilor de tip IgG este utilă în screening-ul infecției. De asemenea, poate fi folosită în analiza serurilor-perechi, pentru demonstrarea unei creșteri semnificative de anticorpi, ca urmare a unei infecții recente sau recurente. Prezența anticorpilor de tip Ig A este asociată cu o infecție activă, fie că este vorba de o infecție primară, cronică sau reinfecție.

*Reacția de fixare a complementului* este cea mai utilizată reacție de diagnostic în LGV. Serologia poate fi de valoare în diagnosticul LGV, deoarece mulți clinicieni nu au acces la serotipizarea sau genotiparea. Titrurile de fixare a complementului de 1:64 sau mai mult pot susține diagnosticul LGV în contextul clinic adecvat. În LGV este dificilă urmărirea în dinamică a titrului de anticorpi deoarece boala are o evoluție cronică și bolnavul se prezintă de obicei, după ce perioada acută a bolii a trecut.

În psitacoză, însă, se efectuează RFC pe seruri pereche. O creștere de peste 4 ori a titrului inițial confirmă diagnosticul.

Rezultatele bune s-au obținut în utilizarea *testului Elisa* în diagnosticul pneumoniei chlamydiene la copii, prin evidențierea anticorpilor din clasa IgM datorită titrului mare al acestor anticorpi în pneumonie spre deosebire de infecțiile genitale unde titrul este moderat. Sensibilitatea acestei metode în diagnosticul pneumoniilor la copii este similară microimunofluorescenței.

**Testarea sensibilitatii la antibiotice** întâmpină o serie de dificultăți: se efectuează pe culturi de celule, după efectuarea pasajelor multiple, pentru unele antibiotice ca ampicilina, amoxicilina și cefalosporine, cu discrepanțe între CMI și CMB, în lipsa unei metode standardizate.

**Tratament:** Tetraciclina reprezintă antibiotice de elecție, cu rezultate satisfăcătoare în infecțiile acute. Macrolidele au o activitate antichlamyidiană asemănătoare tetraciclinelor. Eficiența terapeutică a eritromicinei este sub nivelul celei obținute în tratamentul cu tetraciclina. Azitromicina inhibă dezvoltarea chlamydiilor la începutul ciclului de dezvoltare. Acțiunea antichlamyidiană depășește în timp mult acțiunea eritromicinei.



Figura 59: Kit diagnostic *Chlamydia*

### 13. ROLUL LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL INFECȚIEI ASOCIATE ASISTENȚEI MEDICALE

Infecția nosocomială sau asociată asistenței medicale (IAAM) este infecția contactată în spital, sau alte unități sanitare cu paturi și se referă la orice boală datorată microorganismelor, care poate fi recunoscută clinic sau microbiologic și care afectează fie bolnavul (datorită internării lui în spital, sau îngrijirilor primite), fie personalul medical (datorită activității sale), indiferent dacă simptomele bolii apar sau nu în timp ce persoana respectivă se află în spital.

Poate evolua sub forme sporadice sau sub forma unor izbucniri epidemice, uneori cu evoluție foarte gravă. Asistăm în prezent la **apariția de bacterii oportuniste multirezistente (MDR), extensiv rezistente (XDR) sau chiar pan rezistente (PDR) la antibiotice**, precum și apariția a tot mai multe IAAM produse de levuri, la bolnavii aflați în stare critică, mult mai fragili din punct de vedere al rezistenței lor antiinfecțioase. IAAM rămân în continuare o realitate contemporană în toate structurile spitalicești.

#### Patogeni nosocomiali

S-a constatat că periodic apare câte o modificare majoră și deseori inexplicabilă a etiologiei IAAM. Dacă în anii '50 cele mai frecvente cauze de infecții nosocomiale erau cocci Gram pozitivi (CGP), în anii '60 a fost constatată creșterea importanței bacililor gram negativi (BGN) aerobi, în anii '70 -'80, *S. aureus* redevine cel mai important patogen nosocomial, urmat de *E. coli*, *P. aeruginosa*, precum și o serie de alți germeni condiționat patogeni, iar **în prezent** asistăm la re-emergenta **tulpinilor de BGN MDR**.

*S. aureus*, prin puterea sa crescută de dispersie, prezența pretutindeni în spitale, rezistența sa crescută în mediul extern, rata crescută a purtătorilor sănătoși în special în rândul personalului medical, precum și prin rezistența la antibiotice s-a conturat multă vreme ca fiind agentul etiologic primar al IAAM, atât în secțiile de pediatrie cât și de adulți. Meticilina a fost prima penicilină semisintetică introdusă în scopul rezolvării problemelor induse de stafilococul producător de beta lactamază, dar foarte rapid s-a constatat apariția tulpinilor de *S. aureus* rezistente la meticilină (**MRSA**), dar și a stafilococilor coagulazo-negativi (SCN) (**MRSCN**). Rezistența la meticilină este considerată marker al multirezistenței la antimicrobiene, conferind pe de o parte rezistența la toate beta-lactaminele, iar pe de altă parte și la alte clase de antibiotice (în cazul fenotipurilor asociate de rezistență). De aceea spectrul de sensibilitate al MRSA și MRSCN trebuie **monitorizat cu atenție**. **Markerul surogat de investigare a rezistenței la meticilină pe antibiograma difuzimetrică este cefoxitinul**. Tratamentul infecțiilor cu MRSA sau MRSCN, în cazul tulpinilor MDR (atunci când nu există alte opțiuni terapeutice), se face cu glycopeptide (Vancomicina, Teicoplanina) sau cu **Linezolid** (antibiotic introdus relativ recent pe piață).

**Enterococul rezistent la vancomicina (VRE)** este un alt patogen nosocomial Gram pozitiv, care se transmite cu ușurință printre pacienții spitalizați, în special pe cale fecal-orală. Este dificil de tratat, fiind deseori vorba despre tulpini MDR, cu mecanisme cumulate de rezistență la numeroase clase de antibiotice. **Linezolidul** poate fi o opțiune terapeutică și în acest caz.

În prezent **tulpinile de BGN cu rezistență dobândită la chimioterapiile antiinfecțioase**, reprezintă cele mai reprezentative exponente ale multirezistenței bacteriene, cu implicații clinice deosebite privind evoluția și opțiunile terapeutice. În ultimii ani infecțiile produse de BGN-MDR au devenit endemice în multe unități medicale terțiare, iar izbucniri epidemice nosocomiale cu astfel de microorganisme sunt raportate în toată lumea. Se constată în special creșterea prevalenței

tulpinilor secretoare beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE), care asociază deseori rezistența la fluoroquinolone și aminoglicozide. Această situație a condus la utilizarea carbapenemelor și polimixinelor în terapie, rezistența la carbapeneme fiind semnalată rapid în special la tulpinile de *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. și *P. aeruginosa*. Interesul pentru germeii din grupul *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* a crescut de asemenea în ultimul timp, pe de o parte datorită emergenței IAAM cauzate de tulpini MDR, precum și a faptului că acești patogeni sunt natural rezistenți la colistin, astfel încât ultima opțiune terapeutică în cazul tulpinilor MDR devine ineficientă. Multirezistența acestor tulpini la majoritatea antibioticelor folosite în mod curent este deseori prezentă la tulpinile izolate în secțiile cu risc, de tipul celor de terapie intensivă și cu profil chirurgical.

*C.difficile*, este un bacil Gram pozitiv anaerob care poate contamina mediul spitalicesc timp de mai multe luni, fiind sursa a epidemiilor nosocomiale.

### **Principalele IAAM**

Cele mai importante IAAM sunt: infecțiile de situs chirurgical (SSI), pneumoniile, infecțiile tractului urinar (UTI) și septicemiile. Definițiile de caz ale acestor infecții vor fi studiate la Epidemiologie.

### **Rolul Laboratorului de microbiologie**

Laboratorul de microbiologie deține un rol cheie în controlul IAAM prin:

**Identificarea corectă** a microorganismelor implicate în epidemiile nosocomiale, dar și a tulpinilor cu potențial nosocomial, precum și prin furnizarea datelor privind **trendurile locale de rezistență**, în vederea up-datării și eficientizării continue a terapiei empirice, dar și a celei țintite, adaptate microorganismului identificat,

Efectuarea periodică de probe microbiologice de autocontrol

**Testele de autocontrol** sunt cele efectuate de o unitate sanitară în vederea cunoașterii circulației germeilor patogeni în mediul spitalicesc și a evaluării eficienței procedurilor de curățenie și dezinfecție cu scopul prevenirii apariției IAAM. Acestea cuprind:

1. **Teste de sterilitate** sunt testele efectuate pentru controlul sterilității instrumentarului și altor materiale sanitare (prin proceduri de sterilizare fizică și chimică). Recoltarea se realizează în bulion simplu, bulion thioglicolat sau se vor folosi tampoane sterile în care s-a pus în 1 ml de ser fiziologic în condiții de sterilitate. În aceste probe nu este permisă ceșterea niciunui microorganism.

2. **Teste de aeromicrofloră** sunt testele efectuate pentru controlul gradului de încărcare a aerului cu floră microbiană atmosferică în zonele de risc (săli de operație, de naștere, saloane de terapie intensivă, boxe de nou-născuți, etc.). Recoltarea se realizează prin metoda sedimentării Koch: se vor folosi 2 grupe de plăci Petri (câte o placă de geloză simplă și o placă de geloză-sânge). Un grup de plăci se va expune în mijlocul încăperii pe o masă/la înălțimea unei mese, al doilea grup va fi expus într-un colț al încăperii la înălțimea unei mese. Numărul de plăci necesare se calculează în funcție de volumul încăperii. Expunerea se va face prin ridicarea capacului cutiilor Petri și așezarea capacelor cu deschiderea în jos alături de cutiile Petri cu mediile selectate. Timpul de expunere va fi strict cronometrat din momentul ridicării capacelor de la plăcile Petri cu medii, acestea urmând să fie lăsate deschise 10 minute. Plăcile se vor incuba 24—48 de ore la 37°C, după care se numără coloniile crescute pe suprafața gelozei simple după 48 de ore și numărul total de colonii hemolitice crescute pe suprafața gelozei-sânge după 24 de ore. Recoltarea se mai poate realiza cu ajutorul unor echipamente prevăzute cu dispozitive cu sită, care permit ca aerul să fie tras printr-o placă perforată (sită) cu găuri, iar particulele sunt depuse pe mediul de cultură turnat în placa Petri fixată dedesubt.

Raportarea se face prin aplicarea formulei lui Omelianski:  $N \times 10000 / (S \times K) =$  număr germeni/mc aer, unde: N = număr de colonii de pe suprafața plăcii Petri; S = suprafața plăcii Petri în cm<sup>2</sup> (63,5 cm<sup>2</sup>); K = coeficientul timpului de expunere k = 1 pentru 5 minute, k = 2 pentru 10 minute, k = 3 pentru 15 minute.

Se raportează: numărul total de germeni/ m<sup>3</sup> aer și numărul total de germeni hemolitici/m<sup>3</sup> aer.

3. **Teste de sanitație** sunt teste de verificare a eficienței curățeniei și dezinfecției suprafețelor și altor materiale (vănițe, mobilier, echipament medical, lenjerie de pat, etc.) efectuate în cadrul unității sanitare. Recoltarea se realizează cu un tampon steril umezit în 1 ml ser fiziologic steril cu care se șterge o suprafață de 25 cm<sup>2</sup> prin trecerea tamponului de 2—3 ori în sensuri diferite pe toată suprafața celor 25 cm<sup>2</sup> și se va imersa tamponul în 1 ml ser fiziologic din recipient. Se fac diluții zecimale, după care se însămânțează pe o placă de geloză-sânge și un mediu lactozat. Interpretare : se numără coloniile de pe fiecare placă și se aplică o formula de calcul:

$(N1 \times D1 \times \text{cantitatea dispersată} / 25 \text{ cm}^2 + N2 \times D2 \times \text{cantitatea dispersată} / 25 \text{ cm}^2 = \text{nr. germeni} / \text{cm}^2$ , unde: N1, N2 — numărul de germeni de pe fiecare placă de geloză-sânge; D1, D2 — diluțiile folosite pentru fiecare placă Petri). Se raportează: numărul de germeni/ cm<sup>2</sup> de suprafața ștersă și prezența oricăror germeni patogeni identificați. Se consideră curată o suprafață/un material moale pe care se dezvoltă sub 5 colonii/ cm<sup>2</sup> și nu sunt prezenți germeni patogeni (de tipul: *Staphylococcus aureus*, Strept.beta-hemolitic, *Escherichia coli*, *Proteus* sau alti bacili gram negativi non-fermentativi: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.)

4. **Screeningul pacienților internați în secții cu risc** (prin recoltare de exudate nazale, perineale, probe tegumentare), în vederea depistării purtătorilor de germeni MDR (MRSA, VRE, enterobacterii carbapenem-rezistente), dar și **al personalului medical** (prin recoltare de exudate nazale, faringiene, probe tegumentare), în vederea depistării purtătorilor de MRSA.

Probele de screening se însămânțează pe medii cromogene selective în vederea identificării prezumtive a tulpinilor MDR/XDR/PDR menționate (MRSA, VRE, producătoare de BLSE sau rezistente la carbapeneme).

5. **Participarea activă împreună cu serviciul de prevenire a IAAM (SPIAAM)** la identificarea sursei de infecție și a căilor de transmitere a agenților nosocomiali,

6. **Colectarea tulpinilor de germeni MDR** cu potențial nosocomial în vederea confirmării mecanismelor de rezistență (prin teste moleculare sau alte teste de confirmare).

7. **Colaborarea efectivă cu clinicienii**, în vederea supravegherii politicii de antibioterapie din spitale. În special în timpul epidemiilor (dar nu numai) utilizarea chimioterapicelor antiinfecțioase va fi limitată în mod selectiv. Trebuie în general încurajată utilizarea de antibiotice mai puțin asociate fenomenului de rezistență (doxiciclină, amoxicilină, trimetoprim sulfametoxazole, nitrofurantoin, amikacină). Doar printr-o bună colaborare microbiolog - epidemiolog - clinician se va reuși prevenirea în timp util și supravegherea apariției IAAM.





Figura 60: Echipament pentru testele de aeromicrofloră

*Metoda tamponelor*

- ▶ Măinile se șterg cu tamponul umezit începând cu partea dorsală, mai puțin contaminată, și continuând cu suprafața palmară, spațiile interdigitale, pliurile periungھیale.
- ▶ Tamponul imersat în 1 ml mediu de transport este expedit la laborator în cel mult două ore pentru examinare.



Figura 61: Recoltarea probelor de pe tegumente

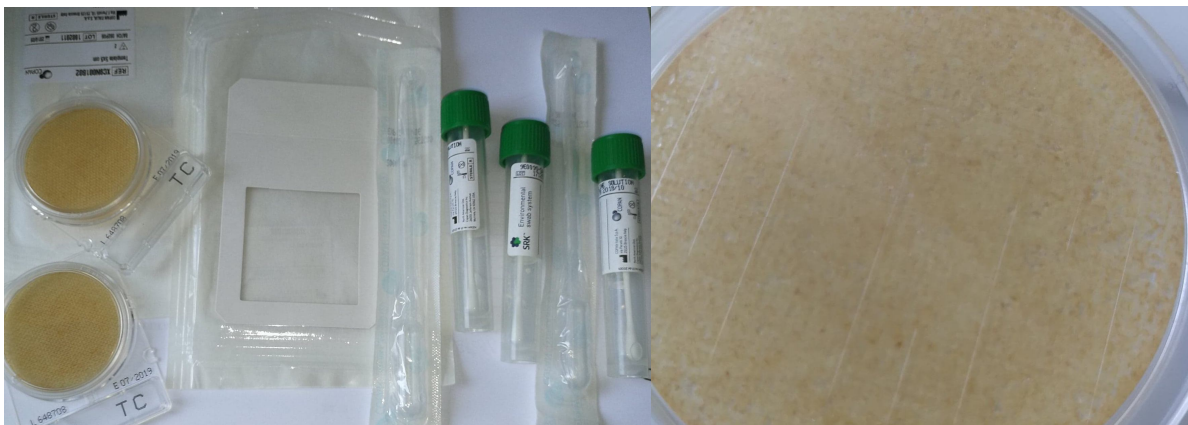


Figura 62: Kit pentru recoltarea probelor de pe suprafețe

## 14. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE FUNGI

Fungii reprezintă un grup divers de microorganisme eukariote implicate în etiologia infecțiilor umane, numite micoze. Micozele apar mai frecvent la indivizii imunodeprimați (cei cu transplant de măduvă osoasă, neutropenici, cei cu neoplasme sau SIDA). Fungii pot fi saprofiți, comensali sau paraziți și determină infecții pe cale exogenă sau endogenă.

Există numeroase criterii de clasificare a fungilor, dar criteriul morfologic este cel mai cunoscut și acceptat în micologia medicală. Acesta se bazează pe aspectul și structura părții asimilatoare a fungului-talul și permite descrierea a trei tipuri principale de micromiceti:

- Filamentoși: microorganisme pluricelulare, cu talul alcătuit din filamente tubulare, separte sau nu, denumite hife;
- Levuriformi: microorganisme unicelulare, rotunde sau alungite ce se multiplică prin burjeonare;
- Dimorfici: microorganisme care apar sub formă de levuri în țesuturile organismelor parazitare și sub formă filamentoasă când sunt cultivați la temperatura camerei pe medii uzuale. Astfel fungii se împart în trei mari grupe: dermatofiți, levuri și mucegaiuri.

### 14.1. Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri

#### 14.1.1. Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri din genul *Candida*

Levurile din genul *Candida* sunt paraziți umani și animali. *Candida albicans* este principala specie implicată în etiologia micozelor sistemice (65-70%). Alte specii ale genului *Candida* sunt: *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata* etc.

**Semnificația clinică.** Odată ce levurile au învins sistemul imun deteriorat al gazdei, ele pot cauza o largă varietate de infecții: de la candidozele cutanate și mucoase superficiale, până la cazuri de candidoze sistemice, când celulele levurice penetrează epiteliile, diseminând în organism, pe cale sanguină și infectând o largă varietate de organe (inclusiv rinichi, ficat, creier).

Candidozele se împart în două mari grupe:

#### 1. Candidoze superficiale:

- candidoze mucoase: bucofaringiene (muguet), anale, genito-urinare.
- candidoze cutanate: onix, perionix, intertrigo, foliculite.

**2. Candidoze sistemice:** septicemice sau viscerale care iau forme variate (infecții urinare, osteoarticulare, renale, pulmonare, oculare, cardiace, peritoneale, etc); acestea pot fi iatrogene, nosocomiale sau endogene.

**Diagnosticul de laborator** presupune izolarea și identificarea speciei responsabile de producerea bolii, înaintea instalării terapiei antifungice. Dacă s-a instituit deja un tratament antifungic, recoltarea produsului patologic se va face după cel puțin trei zile de la întreruperea tratamentului.

**Recoltarea** produselor patologice se face diferit, în funcție de localizare (Tabel 7).

Tabel 7 : Recoltarea produselor biologice în micoze

Afecțiune	Produs patologic
Intertrigo (leziuni uscate)	Scuame
Leziuni cutanate umede	Secreție
Onix	Fragmente de unghie
Perionix	Puroi, scuame periunghiale
Muguet bucal, Balanite, Vaginite	Lichid din serozitate/secreție
Enterite	Materii fecale
Gastrite	Lichid de lavaj gastric
Infecții respiratorii	Lichid de aspirație bronșică
Meningite, encefalite	LCR
Infecții urinare	Urină
Septicemie, endocardite	Sânge

Prelevatele se vor transporta rapid în laborator unde se vor examina și însămânța pentru a evita multiplicarea levurilor în produsul patologic. Pentru produsele patologice semi-lichide (puroi, lichidul din serozitate) se utilizează medii de transport (Portagerm, Mycoline, Synthesis).

**Examenul direct** constituie o etapă importantă a diagnosticului care permite evidențierea la microscop, a levurilor: elemente ovalare de 4-6  $\mu\text{m}$ , asociate eventual cu prezența filamentelor miceliene.

**Preparatul nativ lamă-lamelă:** pe o lamă de sticlă bine degresată se depune materialul recoltat. Se adaugă apoi 2-3 picături soluție disociantă (KOH sau NaOH în concentrație de 10-30% sau dizolvant de sulfură de sodiu) și se acoperă cu o lamelă. Materialul de examinat va fi lăsat să se disocieze 20-30 minute sau chiar o oră (fragmente din unghii) înainte de examenul microscopic. Lichidul de disociere se păstrează în flacoane de culoare verde sau neagră, bine închise, în locuri ferite de lumină.

**Tehnica colorației.** Levurile din genul *Candida* se colorează după metoda Gram, albastru de metilen, May-Griinwald-Giemsa. Celulele levurice sunt sferice sau ovalare, cu muguri multipolari numiți blastospori (pseudomicelii formate din celule alungite așezate cap la cap). Se mai pot observa chlamidospori intens colorați, care apar ca celule sferice cu diametrul mai mare decât cel al celulelor levurice. La colorația Gram, candidele sunt gram-pozitive.

**Cultivare.** Speciile din genul *Candida* cresc pe mediul Sabouraud simplu, Sabouraud cu adaus de gentamicină și cloramfenicol sau Sabouraud cu actidionă și roșu fenol (mediul Mycoline). Perii, scuamele și fragmentele de unghie sunt mai întâi fragmentate și apoi însămânțate. Materialul se depune pe suprafața mediului de cultură în puncte diferite. Însămânțarea nu trebuie să dureze mai mult de 40-50 secunde și se va face de preferință la adăpost de curent și în atmosferă sterilă (boxă specială sau utilizarea unei lămpi cu ultraviolete). Urina și alte produse patologice lichide se însămânțează cu o pipetă Pasteur sterilă în 2-3 tuburi cu mediu Sabouraud lichid. Materiile fecale se lasă la macerat 24 de ore într-o soluție de ser fiziologic și antibiotice, după care se însămânțează minimum în 2 tuburi. Fragmentele de țesut obținute prin biopsie se triturează într-un mojar steril și apoi sunt trecute, în fragmente foarte mici pe mediul corespunzător.

**Incubarea** se face la 35-37° C, 24-48 h. *Candida albicans* dezvoltă colonii albe, cremoase, mate, cu margini regulate.

Pentru identificarea *Candidaei albicans* se recomandă:

- trecerea culturii pe mediul P.C.B. Langeron cu cartofi, morcovi și bilă, acest mediu favorizând producerea de clamidospori, caracteristici pentru *Candida albicans*;

- metodă rapidă de identificare a *Candidaei albicans* se bazează pe germinația rapidă a levurilor, care emit filamente în prezența serului uman sau animal. Se introduc câteva picături dintr-o suspensie de *Candida* sp. într-o eprubetă care conține 0,5 ml ser uman. Se agită, se ține apoi la termostat timp de 4 ore la 37°C după care se examinează o picătură la microscop. Dacă celulele de *Candida* încep să emită filamente, este vorba de *Candida albicans*.

- pentru diferențierea coloniilor de *Candida albicans* de alte specii de *Candida*, produsul patologic se poate însămânța pe mediul CHROMagar (agar, peptonă, amestec special cromogen, cloramfenicol). După incubarea la 37° C, timp de 48h, ***C. albicans* produce colonii verzi, *C. tropicalis*, colonii albastre metalice, *C. krusei*, colonii roz, iar alte specii dau naștere unor colonii albe.**

- **Galeriile Api Candida** permit identificarea rapidă (18-24 ore) a 14 specii de levuri: *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guillierinondii*, *C. kefyri*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum (candidum și capitatum)*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Trichosporon* sp.

- **WELL D-ONE® PENTRU FUNGI** este un sistem compus din 24 de godeuri care conțin substraturi biochimice pentru identificarea celor mai importanți fungi clinici și un test de susceptibilitate antifungică. Identificarea se bazează pe utilizarea diferitelor zaharuri și prin prezența unui substrat cromogen. Sistemul este inoculat cu o suspensie pentru fungi și se incubează la 36 ° C ± 1 timp de 24-48 ore. Microorganismul este identificat printr-un cod numeric obținut luând în considerare reacția colorimetrică a testului biochimic ca urmare a creșterii și culoarea sondei care conține suportul cromogen.

**Alte sisteme de identificare** includ: Auxcolor (Bio-Rad), Candifast, Fungicrom (International Microbio), precum și mediile cromogene: Candichrom II, Albicans ID2 agar, CHROMagar candida, Oxoid Chromogenic Candida Agar.

*C. albicans* fermentează glucoza și maltoza, nu fermentează zaharoza, lactoza și rafinoza. *C. tropicalis* fermentează glucoza, maltoza și zaharoza, dar nu fermentează lactoza și rafinoza. *C. krusei* fermentează doar glucoza. *C. guilliermondii* fermentează glucoza și zaharoza. nu fermentează maltoza, lactoza și rafinoza.

**Sensibilitatea la antifungice - antifungigrama.** Etapa finală a diagnosticului micologic o reprezintă efectuarea antifungigramei. Determinarea sensibilității levurilor la antifungice se bazează pe creșterea sau inhibiția creșterii acestora în prezența diferitelor substanțe antifungice.

**ATB-fungus** testează sensibilitatea la 6 antifungice: 5-fluorocitozină, amfotericină B, nystatin, miconazol, econazol, ketoconazol. Citirea rezultatelor se face după 24-48 ore de incubare la 30°C, rezultatele exprimându-se în sensibil și rezistent. Sistemul automat Vitek 2C permite testarea sensibilității la amfotericină B, 5-fluorocitozină, fluconazol, micafungin, caspofungin, voriconazol.

**Antifungigrama - metoda Kirby-Bauer.** Antifungigrama clasică difuzimetrică este un test calitativ.

Principiul testării sensibilității unui inocul din cultura cu fungi patogeni este similar cu cel al testării față de medicamentele antibacteriene. Pe suprafața unui mediu de cultură agarizat (mediul Sabouraud) se însămânțează un inoculul fungic standardizat peste care se aplică discuri de antifungice. După incubarea la 37°C pentru speciile de *Candida* se citesc diametrul zonelor de inhibiție iar sensibilitatea este clasificată pe categorii: S (sensibil), R (rezistent). În prezent

tehnica nu este standardizată pentru toate antifungicele, dar datorită simplității poate fi folosită în infecțiile fungice curente, non-sistemice.

**Tratament:** În prezent, există o gamă variată de antifungice, clasificate, în general, după modul de acțiune în: azoli (Clotrimazol, Ketoconazol etc.), poliene (Amfotericina B, Nistatin etc.), echinocandine (Caspofungin, Micafungin etc.), antimetaboliți (5-flucitozina).

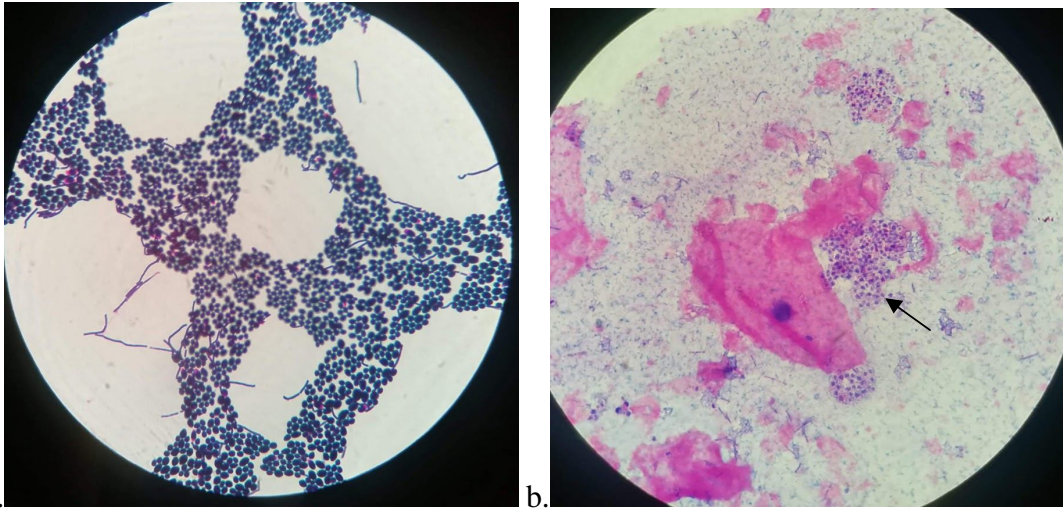


Figura 63: Examen microscopic fungi: (a) cultură - colorație Gram, (b) produs biologic-colorație Pick

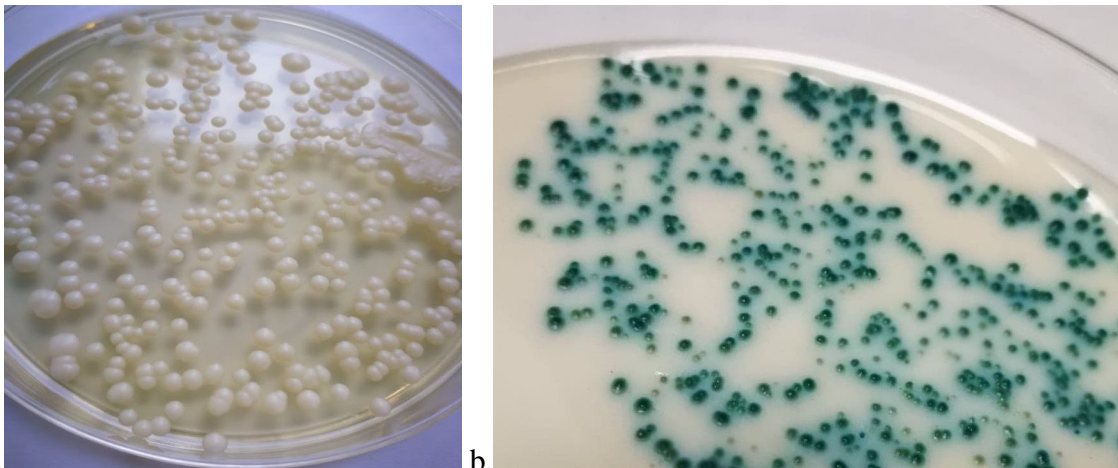


Figura 64: Cultură fungi (a) mediul Sabouraud, (b) mediul Brilliance candida- *Candida albicans*

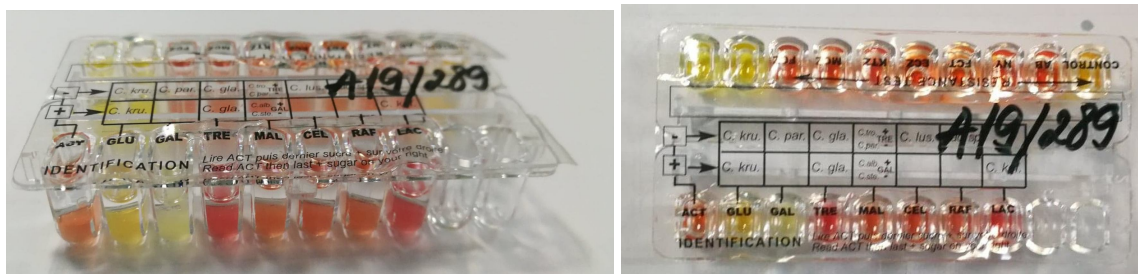


Figura 65: Sistem pentru identificare și antifungigramă- Candifast

## 14.2. Diagnosticul de laborator al afecțiunilor produse de mucegaiuri

### 14.2.1. Genul *Aspergillus*

Reprezentanții genului sunt: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. versicolor* sunt fungi filamentoși și rezistenți.

**Semnificația clinică.** Infecția umană este favorizată de existența unor leziuni bronșice sau pulmonare sau este condiționată de deficitul imun cauzat de cortico-terapie, iradiere, imunodepresoare etc.

**Diagnostic de laborator.** Produsele patologice sunt reprezentate de spută, lichid de spălătură bronho-alveolară, fragmente de țesut recoltate prin biopsie, sânge.

**Cultivare.** *A. fumigatus* crește pe mediu Sabouraud fără cicloheximid, la 37°C, în aproximativ 3 zile (uneori mai târziu). Coloniile sunt de culoare verde-închis. Coloniile de *A. flavus* sunt galben-verzui (pe fața opusă a plăcii, coloniile sunt roșii-brune), cresc după aproximativ o săptămână de incubare la 37°C, iar cele de *A. niger* sunt alb-gălbui, și devin apoi negre (pe dosul plăcii sunt alb-gălbui).

La **examenul microscopic din cultură**, *A. fumigatus* prezintă capete sporulante cu vezicule și un șir de filide la nivelul celor două treimi externe ale suprafeței. Conidiile sunt dispuse în lanțuri paralele. *A. niger* prezintă capetele sporulante cu conidiofori, vezicule globuloase și filide dispuse în unul sau două șiruri pe toată suprafața.

Recent au fost introduse **teste serologice** comerciale (Platelia *Aspergillus* ELISA, Bio-Rad), utilizând metoda ELISA dublu-sandwich pentru detectare antigenemiei din infecțiile invazive.

#### **Detecția antigenelor**

1) Evidențierea antigenelor galactomannan în ser, urină, lavaj bronhoalveolar este utilă în diagnosticul aspergilozei invazive și în evaluarea răspunsului la tratament.

Corelație : - dispariția antigenelor semnifică vindecarea,  
- menținerea antigenelor semnifică o evoluție nefavorabilă.

2) Platelia *Aspergillus* (EIA- Sanofi Diagnostic Pasteur)

Determinarea markerului 1,3 Beta-D-Glucan (BG) - marker pentru infecție invazivă, recomandat de 2-3 x/săptămână.

Serologia - titrarea Ac este utilă în infecția invazivă.

**Micotoxinele** sunt substanțe chimice produse de anumite specii de mucegaiuri (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., etc.). Ele pot fi puse în evidență și în sporiile acestora sau în substratul pe care cresc fungii.

Există o varietate foarte mare de micotoxine dar nu toate sunt importante din punctul de vedere al siguranței alimentației umane. Cele mai importante micotoxine sunt aflatoxinele, ocratoxinele, patulina și ergotoxina. Aflatoxina este o substanță toxică cu potențial cancerigen și imunorepresiv produsă de anumite tipuri de mucegaiuri. Prima dată aflatoxina a fost identificată la *Aspergillus flavus* (mucegai de la care i s-a dat și denumirea). Aceste substanțe produc afecțiuni grave mai ales la nivelul ficatului și al vezicii biliare.

**Sensibilitate la antifungice.** *Aspergillus* sp. sunt sensibile la itraconazol, 5-fluorocitozină. Sunt rezistente la amfotericină B.

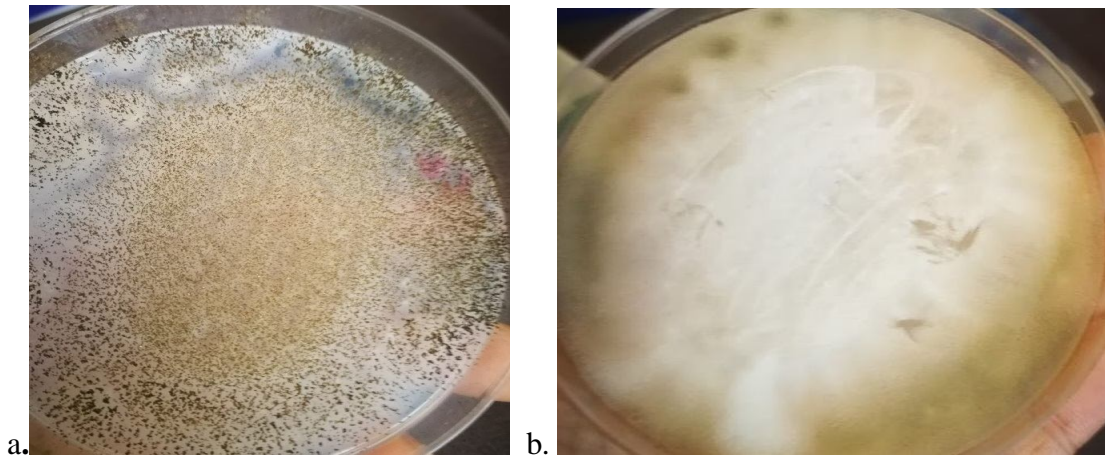


Figura 66: Cultură: (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus fumigatus*

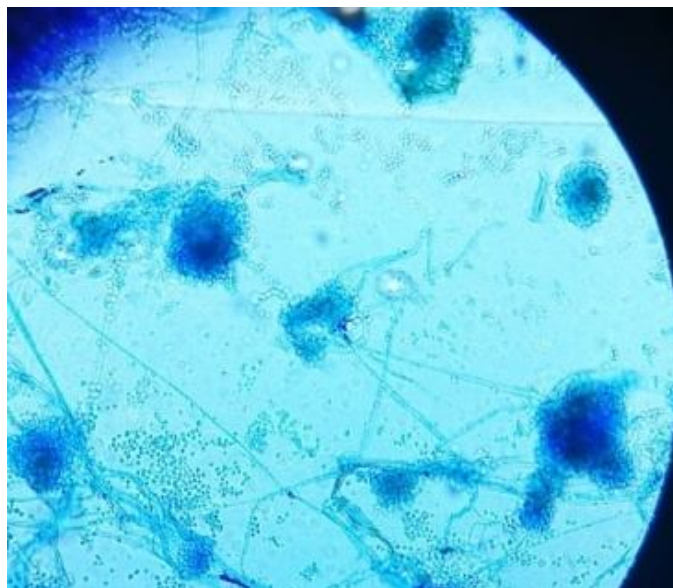


Figura 67: Examen microscopic *Aspergillus fumigatus*

## 15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR VIRALE

Metode:

- A. Citologia
- B. Microscopia electronică
- C. Cultivarea
- D. Serologia
- E. Metode moleculare (detectia de material genetic i.e. acizi nucleici)

### 15.1. Citologia

Citologia este o metodă rapidă care presupune detectia efectelor produse de virus asupra structurilor celulare: modificări morfologice, apariția de nuclei multipli în celulele infectate, liza celulelor infectate, vacuolizarea, formarea de sinciții prin fuziune între celule, apariția de incluziuni intranucleare/intracitoplasmice, ciliocitoforia (vezi mai jos).

Citologia este aplicabilă într-o mare varietate de infecții virale. Astfel, infecțiile oculare, respiratorii, genitale și ale tractului urinar reprezintă localizări care se pretează foarte bine la recoltarea de probe biologice în vederea diagnosticului citologic rapid.

Prezentăm în cele ce urmează câteva exemple de aplicații ale citologiei în diagnosticul infecțiilor virale.

Citologia urinară poate releva modificări celulare în infecții cu cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), papovavirusuri etc. Infecția cu CMV produce efecte citologice cum sunt: celule mărite de volum, cu incluziuni intranucleare mari și incluziuni citoplasmice bazofile.

În pneumonia cu virus rujeolic, care poate surveni la persoane imunosupresate, se pot observa celule epiteliale gigante multinucleate, cu incluziuni eozinofile intranucleare și intracitoplasmice, însă modificări similare sunt produse și de infecțiile cu virus sincițial respirator.

În infecții cu adenovirusuri, celulele prezintă incluziuni mari intranucleare și *ciliocitoforie* (smocuri de cili, ramașite ale epitelului ciliat bronșic, prezente în diferite fluide biologice, cum ar fi secrețiile respiratorii).

De menționat că modificările celulare descrise în exemplele de mai sus pot fi nespecifice sau comune mai multor afecțiuni virale și non-virale, astfel încât diagnosticul etiologic necesită efectuarea de teste suplimentare.

### 15.2. Microscopia electronică

Microscopia electronică permite detectia și identificarea virionilor în probe clinice prin vizualizarea directă a particulelor virale. Metoda are o specificitate înaltă însă necesită echipamente costisitoare (atât ca preț de achiziție cât și ca întreținere), personal înalt calificat și experimentat, sensibilitatea metodei este relativ scăzută (necesită prezența unui număr mare de particule virale în proba examinată pentru un rezultat pozitiv), este laborioasă și presupune examinarea a câte unei sigure probe (ca atare nu este aplicabilă în diagnosticul de rutină).



Aplicabilitate: vizualizarea rotavirusurilor în probe de materii fecale, a virusului rabic în probe de țesut cerebral, vizualizarea virionilor de virus gripal, a filovirusurilor (e.g. Ebola) etc.

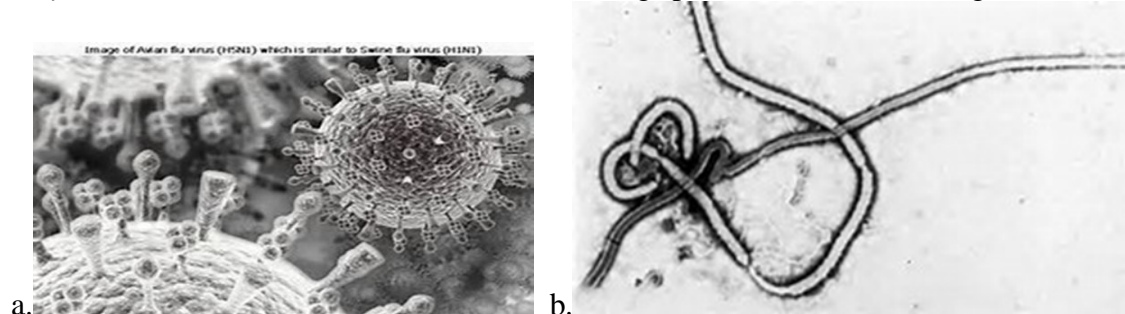


Figura 68: Microscopie electronică (a) Virus gripal, (b) Virus Ebola

### 15.3. Cultivarea

Virusurile pot fi cultivate pe culturi celulare și pe ouă embrionate.

#### 1. Culturi celulare

Unele virusuri pot fi cultivate pe culturi de celule, diagnosticul bazându-se pe efectele ceșterii virale asupra celulelor din cultură.

Sunt utilizate următoarele tipuri de culturi celulare:

- Primare – obținute din organe de animale prin liza enzimatică și creștere în monostrat la care se adaugă factori de creștere (de exemplu, ser de vițel),
- Secundare – obținute prin disociere (cu tripsina) a culturilor celulare primare urmată de transferuri (pasaje) succesive ale inoculului viral de cercetat,
- Linii celulare – celule tumorale, celule “imortalizate” – procesul presupune o multiplicare continuă indusă artificial în scopuri experimentale; acestea pot susține un număr infinit de transferuri (pasaje).

*Exemple:*

- Cultura primară de celule renale simiene (de maimuță) poate fi utilizată pentru cultivarea orthomyxovirusurilor, paramyxovirusurilor, a unor enterovirusuri, adenovirusuri
- Culturi de celule diploide fetale – utilizate pentru cultivarea herpesvirusurilor, picornavirusurilor, adenovirusurilor

**2. Ouă embrionate de găină:** utilizate pentru cultivarea virusurilor gripale.

### 15.4. Serologia

Metodele serologice sunt utile în cazul virusurilor non-cultivabile, pentru virusuri cu evoluție lentă a infecției precum și pentru evaluarea răspunsului imun.

Principalele metode serologice utilizate sunt:

1. Reacția de fixare a complementului (RFC);
2. Hemaglutinoinhibarea (HAI);
3. Reacția de neutralizare;
4. Imunofluorescența directă și indirectă;

5. Reacții de aglutinare pasivă: Latex-aglutinarea; hemaglutinarea pasivă;
6. Testele imunoenzimatic: ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay"; Western blot;
7. Teste radioimmune ("Radioimmune assay" - RIA)

### 1. Reacția de fixare a complementului (RFC)

RFC are aplicabilitate în diagnosticul unui mare număr de infecții virale (herpesvirusuri, adenovirusuri) dar și bacteriene (sifilis), însă în ultimele decade locul acestei metode a fost treptat luat de reacțiile bazate pe tehnici imunoenzimatic (a se vedea principiul RFC în volum sem I).

### 2. Hemaglutinoinhibarea (HAI)

Acizii nucleici ai unor virusuri codifică proteine de suprafață care au capacitatea de a aglutina hematiile unor specii animale. De exemplu, virusurile gripale posedă o proteină de anvelopă numită hemaglutinina (HA) care se leagă de hematiile determinând aglutinarea acestora (hemaglutinare). Reacția hemaglutininei virale cu hematiile are ca rezultat formarea unei rețele de celule aglutinate care se vor dispune neregulat în tubul sau godeul din placa de microtitrare în care se efectuează reacția. Hematiile neaglutinate se vor depune pe fundul tubului sau godeului sub forma unui buton compact.

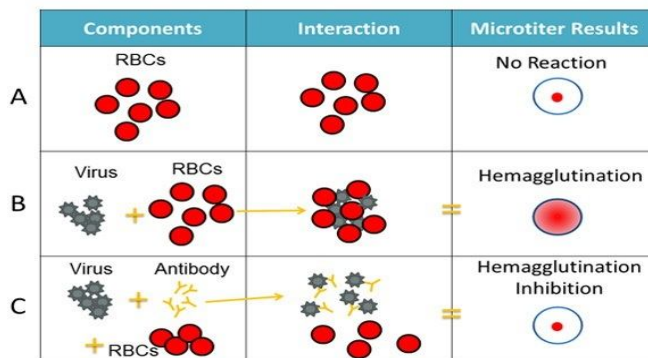


Figura 69: Reacția de hemaglutinoinhibare (HAI)

Hemaglutinarea poate fi utilizată pentru a releva prezența virusului în culturi celulare infectate iar identitatea virusului sau a anticorpilor specifici din serul pacientului pot fi determinate prin HAI (inhibiția specifică a acestei hemaglutinări).

*Principiul* testelor de HAI se bazează pe acțiunea anticorpilor specifici anti-virali (de exemplu anti-virus gripal) care vor preveni atașarea virusului la hematiile. Prin urmare hemaglutinarea este inhibată în prezența anticorpilor specifici anti-virali.

Test **POZITIV** (prezența anticorpilor specifici anti-virali în serul testat) = hemaglutinare absentă.

Test **NEGATIV** (serul de testat nu conține anticorpi specifici anti-virali) = hemaglutinare prezentă.

Metoda este aplicabilă în diagnosticul infecțiilor cu virusuri care au capacitatea de a produce hemaglutinarea, e.g. virusuri gripale, paragripale, adenovirusuri, virusul rubeolic, alphavirusuri, bunyavirusuri, flavivirusuri și unele tulpini de picornavirusuri.

**3. Reacția de neutralizare** (seroneutralizare) se bazează pe capacitatea anticorpilor neutralizanți specifici de a bloca (neutraliza) antigenele corespunzătoare. Spre exemplu, în cazul virusurilor cultivabile, adăugarea de anticorpi neutralizanți determină inactivarea (neutralizarea) virusului

respectiv indicată de absența efectelor asupra culturii celulare. Prezența anticorpilor neutralizanți în serul unui pacient reprezintă un marker al infecției cu virusul respectiv sau o evidență serologică a vaccinării.

Metoda este aplicabilă în infecțiile cu virusuri gripale, paragripale, rotavirusuri, herpesvirusuri etc.

#### **4. Imunofluorescență directă și indirectă**

Imunofluorescența s-a dovedit foarte valoroasă în identificarea antigenelor virale în celule infectate din produse biologice sau în culturi celulare inoculate cu probe biologice recoltate de la pacienți. Produsele biologice pot fi recoltate din tractul respirator superior, tractul genital, mucoasa oculară sau piele cu ajutorul tampoanelor sterile sau prin aspirație nazofaringiană, lavaj traheal, bronșic, puncție pleurală, peritoneală sau cerebrospinală. IF directă și indirectă sunt aplicabile în infecțiile respiratorii cu orthomyxovirusuri, adenovirusuri și herpesvirusuri. De asemenea, metoda are aplicabilitate și pentru țesuturi, fiind utilizată în biopsii, pentru diagnosticul infecțiilor cu herpesvirusuri, sau la necropsii din țesuturi cerebrale pentru diagnosticul post-mortem al rabiei.

#### **5. Reacții de aglutinare pasivă: latex-aglutinarea; hemaglutinarea pasivă**

Aceste teste detectează prezența de anticorpi specifici utilizând particule sau celule inerte (particule latex sau hematii) acoperite cu un antigen cunoscut. Când proba biologică de testat conține anticorpii respectivi, la contactul cu particulele inerte acoperite cu antigen se va produce aglutinarea ca urmare a reacției antigen-anticorp (test pozitiv). În absența anticorpilor în proba de testat, particulele inerte acoperite cu antigen nu se vor aglutina (test negativ). Aplicațiile acestor metode includ teste disponibile comercial sub forma de kituri pentru diagnosticul infecțiilor cu rotavirusuri, adenovirusuri, virusuri gripale etc. dar și pentru infecții bacteriene (e.g. infecții streptococice - determinare de grup), determinare de grup sanguin etc.

#### **6. Teste imunoenzimatic: ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay"; Western blot (a se vedea capitolul de reacții antigen-anticorp din vol I de Lp)**

Aplicabilitatea testelor imunoenzimatic este foarte largă, incluzând o gama variată de infecții bacteriene, virale, fungice, etc. Printre infecțiile virale în care tehnicile imunoenzimatic reprezintă baza diagnosticului etiologic amintim: infecțiile cu virusuri hepatice (A, B, C, D), infecția HIV, rujeola, rubeola, infecția cu virus Epstein-Barr, infecția cu virus urlian.

#### **7. Teste radioimmune ("Radioimmune assay" - RIA) (a se vedea capitolul de reacții antigen-anticorp din vol I de Lp)**

### **15.5. Metode moleculare**

#### Metode de diagnostic molecular al infecțiilor virale

a) Sondele ADN sunt utilizate pentru detecția sensibilă și specifică a genomului viral; detecția se bazează pe complementaritatea dintre secvența sondei ADN și secvența unei anumite secțiuni din genomul virusului de cercetat; sondele sunt marcate cu nucleotide tratate radioactiv sau chimic.

b) Hibridizarea *in situ* - detecția de secvențe de genom viral în biopsii de țesuturi cu ajutorul sondelor ADN

c) Tehnicile de hibridizare de tip "Dot blot"

"Southern blot" – hibridizarea ADN-ADN: ADN-ul viral este separat prin electroforeză, transferat pe filtru de nitroceluloză și identificat pe baza mobilității electrofortetice și prin hibridizare cu sonde ADN marcate.

"Northern blot" – hibridizarea ARN-ADN: ARN viral este separat electroforetic, transferat pe filtru de nitroceluloză și detectat prin sonde ADN marcate.

d) Polymerase chain reaction (PCR) – Se bazează pe replicarea semiconservativă a ADN. Se utilizează în biologia moleculară pentru a obține un număr foarte mare de copii de acid nucleic viral, bacterian, etc (amplificare) urmată de identificarea produsului amplificării.

## 15.6. Diagnosticul de laborator al gripei

Principalele metode utilizate în infecția cu virusuri gripale (de tip A și B) sunt:

1. Cultivarea virusurilor
2. Imunofluorescența directă
3. Testele serologice
4. Testele rapide de detecție a antigenelor virale
5. Metodele de diagnostic molecular
  - a. amplificarea acizilor nucleici
  - b. secvențierea acizilor nucleici

1. **Cultivarea virusurilor gripale** reprezintă metoda tradițională pentru diagnosticul etiologic al gripei și presupune recuperarea virusului din probe clinice prin propagare în linii celulare de mamifere sau în ouă embrionate. Introdusă în anii 1940, cultivarea este și astăzi considerată unul dintre "standardele de aur" în diagnosticul infecțiilor virale. Metoda se realizează prin inocularea liniilor celulare sau a ouălor embrionate cu probe biologice și propagarea (realizarea de reinoculări sau "pasaje" succesive) timp de 7-10 zile. Diagnosticul se realizează prin observarea și monitorizarea efectului citopatic, iar confirmarea etiologiei gripale se realizează prin marcarea cu anticorpi specifici, hemadsorbție sau microscopie cu imunofluorescență.

2. **Imunofluorescența directă** se realizează sub forma testului direct cu anticorpi fluorescenți (DFA = Direct Fluorescent Antibody Test). Testul DFA cunoscut și ca testul cu anticorpi imunofluorescenți (IFA = immunofluorescent antibody test), folosește marcarea directă a celulelor epiteliale respiratorii din probele de exudat sau aspirat naso-faringian cu anticorpi specifici anti-virus gripal cuplați cu substanțe fluorescente. Diagnosticul se realizează prin examinarea cu microscopul cu fluorescență care permite vizualizarea particulelor fluorescente (anticorpii fluorescenți fixați la antigenele virale). Metoda este mai rapidă și mai ușor de efectuat decât cultivarea, însă nu oferă posibilitatea identificării subtipurilor virusului gripal de tip A.

3. **Testele serologice** cel mai frecvent utilizate în detectarea anticorpilor specifici anti-gripali sunt hemaglutinoinhibarea (HAI), neutralizarea, fixarea complementului și ELISA.

a. Testul HAI se bazează pe capacitatea anticorpilor anti-hemaglutinina de a preveni atașarea virusului gripal la hematii ale diferitor specii (om, găină, cal, cobai). Testul se realizează cu diluții seriale de ser, iar diluția cea mai mare care previne hemaglutinarea reprezintă titrul HAI al serului respectiv.

b. Neutralizarea este un alt test care masoară nivelul de anticorpi specifici anti-gripali în urma infecției sau după vaccinare. Metoda se bazează pe capacitatea anticorpilor specifici anti-virus gripal de a neutraliza virusul, prevenind astfel infectarea culturilor de celule. Deși testul este mai sensibil decât HAI, aplicarea sa în diagnosticul de rutină este restricționată deoarece presupune utilizarea de particule virale infecțioase în laboratoare cu nivel de biosecuritate 2+ sau

c. Fixarea complementului este o metodă bazată pe imunodifuzie care măsoară răspunsul în anticorpi față de proteinele virale. Datorită sensibilității mai scăzute, metoda a fost înlocuită de HAI, neutralizare sau ELISA.

d. Testele ELISA sunt disponibile fie sub forma de kituri cu plăci de nitroceluloza a 96 de godeuri fie sub forma de stripuri de hârtie (teste rapide). Una dintre limitele majore ale testelor ELISA o reprezintă sensibilitatea mai scăzută în comparație cu tehnicile bazate pe amplificarea de acizi nucleici.

4. **Testele rapide** de detecție a antigenelor virale utilizează anticorpi monoclonali împotriva nucleoproteinelor virale și se bazează fie pe tehnici ELISA fie pe imunocromatografie. Sunt disponibile sub formă de casete, stripuri sau carduri, se efectuează facil și rapid (aproximativ 30 minute), iar rezultatele se interpretează vizual pe baza de modificări de culoare. Aceste teste sunt foarte utile pentru diagnosticul rapid al gripei, rezultatele fiind ulterior confirmate și completate prin metode de diagnostic molecular.



Figura 70: Teste rapide pentru detectarea antigenelor gripale, tulpinile A și B

## 5. Metodele de diagnostic molecular

### a. Amplificarea de acizi nucleici

- RT-PCR (reverse-transcription PCR) este metoda moleculară cel mai frecvent utilizată pentru identificarea virusurilor gripale. Alături de cultivarea virală, este considerată “standard de aur” în diagnosticul gripei. Tehnica include 3 etape esențiale: (1) extracția ARN viral din proba clinică (exudat nasofaringian, aspirat bronșic); (2) revers-transcripția ARN viral într-o catenă unică de ADN complementar (ADNc) sub acțiunea revers-transcriptazei; și (3) amplificarea și detecția produsului amplificat.

- Alte metode de amplificare de acizi nucleici: SAMBA (Simple Amplification-Based Assay), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

b. Secvențierea acizilor nucleici (secvențierea genomica) determina ordinea (secvența) nucleotidelor (A, U, C, G) în fiecare dintre genele din genomul viral (ARN). Se poate realiza secvențierea întregului genom viral (whole genome sequencing) sau secvențierea parțială (partial-genome sequencing) care se focusează pe secvențierea genelor hemaglutininei (HA) și neuraminidazei (NA) care codifică cele două proteine de suprafață ale virusurilor gripale. Aceste proteine de suprafață sunt responsabile de numeroase aspecte ale infecției cum ar fi răspunsul la terapia antivirală, potențialul zoonotic (infecția omului cu virusuri care infectează animalele), gradul de similitudine între virusurile gripale circulante și tulpinile utilizate în vaccinuri, etc.

## 15.7. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale

Termenul de “hepatită virală” desemnează o inflamație acută sau cronică a ficatului determinată de o infecție cu unul dintre “virusurile hepatice” identificate până în prezent. De altfel, tropismul principal pentru țesutul hepatic este singurul caracter comun al acestor virusuri, în rest ele fiind diferite taxonomic, structural, patogenetic și evolutiv.

În cazul diagnosticului de hepatita (inflamație a ficatului), susținut clinic și biochimic, etiologia virală poate fi confirmată prin teste specifice. În cele ce urmează sunt redate principalele metode utilizate în diagnosticul etiologic al hepatitelor virale.

**Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic A (HAV)** se bazează pe următoarele teste:

1. **Anticorpilor anti-HAV IgM** prin ELISA. Testul este înalt sensibil și specific atunci când se realizează din seruri recoltate de la persoane cu simptome tipice de hepatită acută (icter, manifestări digestive acute). De obicei, IgM anti-HAV sunt deja detectabili cu 5-10 zile înainte de instalarea simptomelor și rămân la niveluri ridicate în ser timp de 4-6 luni. După această perioadă, titrul IgM anti-HAV începe să scadă în paralel cu creșterea titrului anticorpilor IgG anti-HAV care vor persista, în general, toată viața în serul pacienților care au trecut prin infecție. De asemenea, IgG anti-HAV sunt detectați și în serul persoanelor vaccinate.
2. **Microscopia electronică** permite vizualizarea și identificarea virionilor HAV în probe de scaun sau de sânge la pacienții cu hepatită virală A. Metoda este de înaltă sensibilitate și specificitate, însă este costisitoare și rar utilizată pentru diagnosticul de rutină.
3. **Metodele moleculare** utilizează tehnici de amplificare a acizilor nucleici (PCR) din probe de ser, scaun și țesut hepatic. Sensibilitatea și specificitatea acestor metode sunt de asemenea foarte ridicate, însă datorită costurilor relative mari sunt mai rar folosite în diagnosticul de rutină. Ele pot fi de mare utilitate în investigarea epidemiilor.

**Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic B (HBV)** se bazează pe următoarele teste:

1. **Metoda ELISA** pentru determinarea de antigene HBV și anticorpi specifici împotriva acestora:
  - a. Antigenul de suprafață al HBV (HBsAg) este decelabil în ser la 2-10 săptămâni de la infecție. În cazul infecțiilor acute autolimitate care evoluează spre vindecare, HBsAg devine nedetectabil după 4-6 luni de la infecție. Persistența acestui antigen în ser pentru mai mult de 6 luni reprezintă un marker serologic de cronicizare a infecției HBV.
  - b. Anticorpilor împotriva antigenului de suprafață al HBV (anti-HBs) apar la câteva săptămâni după ce HBsAg devine nedetectabil în ser și, la majoritatea pacienților, asigură imunitatea de durată (“pe viață”). Prezența sa în ser reprezintă markerul de infecție HBV vindecată sau dovada serologică a vaccinării anti-HBV.
  - c. Anticorpilor de tip IgM împotriva antigenului “core” al HBV (IgM anti-HBc) apar în decursul primelor săptămâni de la infecția acută și rămân detectabili timp de 4-8 luni. În perioada de “fereastră serologică” (de câteva săptămâni până la câteva luni) între dispariția HBsAg și apariția AC anti-HBs, detecția IgM anti-HBc poate fi singurul mod de a face diagnosticul de infecție acută HBV. Unii pacienți cu infecție cronică HBV sau unii purtători asimptomatici de HBV pot prezenta teste pozitive pentru IgM anti-HBc în cursul fazelor de reactivare sau reactivare a

infecției cronice. Acest aspect face ca un test IgM anti-HBc pozitiv să nu fie întotdeauna un marker relevant pentru diagnosticul de infecție acută.

- d. Anticorpul total (IgM+IgG) anti-HBc sunt detectabili, de regulă, la toți pacienții care au fost expuși la HBV (infecții acute sau cronice). Acești anticorpi nu oferă protecție împotriva infecției HBV ei fiind doar markeri serologici ai trecerii prin infecție.
  - e. Antigenul “e” al HBV (HBeAg) este o proteină virală solubilă care apare în ser în fazele precoce ale infecției acute HBV și dispare de obicei la scurt timp după nivelul maxim al alanin aminotransferazei serice. Persistența sa mai mult de 3 luni după debutul bolii este un marker potențial de cronicizare a infecției HBV. Marea majoritate a pacienților cu infecție HBV cronică și HBeAg pozitiv prezintă o afectare hepatică activă.
  - f. Anticorpul împotriva antigenului “e” al HBV (anti-HBe); Seroconversia spontană (negativarea HBeAg și pozitivarea anti-HBe) este de obicei asociată cu scăderea replicării HBV și o evoluție mai favorabilă.
2. **Metodele moleculare** – ADN-HBV poate fi detectat prin teste calitative sau cantitative. Nivelul de ADN-HBV (viremia) se măsoară de regulă prin PCR. Nivelul ADN-HBV se utilizează de obicei pentru a evalua posibilitatea și oportunitatea începerii terapiei antivirale precum și pentru evaluarea răspunsului la tratament.

Tabel 8: Markerii serologici în infecția HBV

Marker	Semnificație	Pozitiv în :
<b>ANTIGENE</b>		
AgHBs	antigen de suprafață (neinfecțios per se)	infecții acute și cronice
AgHBe	- componentă a miezului viral - prezența serică denotă infectivitate	infecții acute și cronice
ADN-polimeraza	idem	idem
<b>ANTICORPI</b>		
AcHBs	- infecție vindecată - imunitate persistentă	- convalescență - după vaccinare
AcHBe	- replicare virală diminuată - infectivitate scăzută sau absentă	- convalescență - infecții cronice cu replicare virală redusă - infecții cronice cu mutante virale
AcHBc	IgM - infecție recentă	primul anticorp care se pozitivează în infecția acută * se poate pozitiva în pusee de reactivare ale unor infecții cronice
	IgG - infecție în antecedente	- markerul cu persistența cea mai îndelungată

**Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic D** – virusul hepatitic D (agentul Delta) este un virus defectiv care nu poate infecta decât împreună cu HBV. Există două posibilități:

- Coinfecția: pacientul se infectează simultan cu HBV și HDV
- Suprainfecția: HDV infectează un pacient purtător al unei infecții HBV preexistente (de obicei o infecție cronică); în această situație, evoluția infecției este agravată

Diagnosticul etiologic se bazează pe detecția prin ELISA a markerilor serologici ai HDV (anticorpi IgM anti-HDV) și pe detecția ARN-HDV în ser prin tehnici de biologie moleculară (PCR).

### **Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic C**

În practica clinică, diagnosticul virologic și monitorizarea infecției HCV se bazează în principal pe utilizarea a 4 markeri:

1. anticorpii totali anti-HCV,
2. antigenul “core” HCV,
3. ARN-HCV
4. genotipul HCV.

Acești markeri sunt determinați prin metode serologice imunoenzimatiche de tip ELISA (anticorpii totali anti-HCV și antigenul core HCV) și metode de diagnostic molecular (ARN-HCV și genotipul HCV).

1. **Anticorpii totali anti-HCV** devin decelabili după aproximativ 60 zile, așa-numita perioadă de “fereastra serologică” (perioada dintre momentul infecției și momentul în care secreția de anticorpi specifici atinge nivelul la care pot fi detectați prin tehnicile de laborator; dacă în această perioadă ARN-HCV și antigenul core HCV sunt deja detectabili). După apariția în ser, acești anticorpi persistă toată viața la pacienții care dezvoltă o infecție HCV cronică.
2. **Antigenul “core” HCV** poate fi detectat în serul persoanelor infectate. S-a demonstrat că nivelul seric al antigenului HCV “core” (detectabil prin tehnici ELISA) este corelat semnificativ cu nivelul ARN-HCV măsurat prin tehnici de biologie moleculară. Astfel, determinarea antigenului “core” al HCV poate constitui o alternativă la măsurarea ARN-HCV, fiind o metodă mai ușor de efectuat, mai ieftină și mai puțin grevată de riscul contaminării probelor din unele tehnici de biologie moleculară. Cu toate acestea, detecția antigenului “core” este mai puțin sensibilă iar nivelul seric al acestui marker poate varia mult de la un individ la altul.
3. **Detecția și cuantificarea ARN-HCV** în sângele periferic reprezintă un marker de încredere al replicării HCV. Acest marker este decelabil la 1-3 săptămâni după momentul infectant, deci cu aproximativ 1 lună mai devreme decât pozitivarea testelor serologice pentru anticorpii totali anti-HCV. Persistența ARN-HCV după o perioadă de 6 luni denotă infecția HCV cronică.



Detecția și cuantificarea ARN-HCV se realizează prin 2 categorii de tehnici de biologie moleculară:

- cele care se bazează pe amplificarea acidului nucleic țintă (cum este PCR) și
- cele care presupun amplificarea de semnal (cum sunt testele “branched DNA”): aceste tehnici folosesc multiple oligonucleotide (nucleotide “de captura”) cu secvențe cunoscute care hibridizează la regiuni complementare din acidul nucleic de testat; sonde de captură, atașate la suprafața unei plăci de microtitrare (cu godeuri) se leagă la nucleotidele de captură fixând astfel acidul nucleic țintă la placă.

#### 4. Determinarea genotipului HCV (genotiparea)

Lanțurile (catenele) de ARN-HCV se clasifică în 6 genotipuri (1-6) și un mare număr de subtipuri. Genotiparea se poate face prin așa-numita analiză directă a secvenței care constă în analiza filogenetică a secvențelor generate după amplificarea prin PCR a unei porțiuni de genom viral și compararea cu secvențe de referință. O altă metodă este hibridizarea inversă a ampliconilor (produsilor de amplificare prin PCR) cu ajutorul sondelor.

Determinarea genotipului HCV este necesară pentru stabilirea schemei terapeutice anti-HCV.

**Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic E (HEV)** se bazează pe detecția în ser a anticorpilor IgM anti-HEV prin ELISA și a ARN-HEV prin PCR.

De menționat că în infecțiile cu virusuri hepatitice, pe lângă afectarea predominant hepatică, pot fi afectate și alte organe și țesuturi. De exemplu, infecția cronică HCV poate determina și manifestări extrahepatice: afecțiuni limfoproliferative (crioglobulinemia), nefropatii, tiroidite, fibroza pulmonară idiopatică, porfiriya cutanată tardivă, lichenul plan, poliartrita cronică.

Pe de alta parte, țesutul hepatic poate fi afectat și în cazul unor infecții cu virusuri al caror tropism principal nu este hepatocitul (CMV, EBV).

### 15.8. Diagnosticul de laborator în infecția HIV

Diagnosticul etiologic al infecției cu HIV se realizează prin **teste ELISA, immunoblot (Western blot) și tehnici de biologie moleculară (PCR)**, în conformitate cu algoritmi de testare elaborate pe baza dinamicii markerilor serologici ai infecției. Markerii serologici pe baza cărora se realizează diagnosticul de infecție, stadializarea, abordarea terapeutică precum și evaluarea răspunsului la tratament sunt: ARN-HIV, antigenul p24 al HIV1, anticorpii (IgM, IgG) anti-HIV1/HIV2.

**Algoritmul de diagnostic** se bazează pe dinamica acestor markeri în serul persoanelor infectate. După momentul infectant, primul marker detectabil în ser este ARN-HIV (la aproximativ 10 zile de la infectare), urmat de pozitivarea testelor pentru antigenul p24 (după aproximativ 2 săptămâni) și de apariția anticorpilor anti-HIV (la aproximativ 20 de zile de la momentul infectant). Anticorpii IgM anti-HIV sunt decelabili cu testele actuale (ELISA de generația a IV-a) la 3-5 zile de la apariția antigenului p24 și la 10-15 zile de la apariția ARN-HIV; anticorpii IgG anti-HIV apar ulterior și persistă pe toată durata infecției.

Tabel 9: Dinamica markerilor infecției HIV

Marker serologic	Apariția în ser după infecție	Metode de detectare
ARN-HIV	≈10 zile	Tehnici moleculare
Antigen HIV1 p24	≈15 zile	Tehnici imunoenzimatic (ELISA)
Anticorpi anti HIV (IgM)	≈20 zile	ELISA + Western blot
Anticorpi anti-HIV (IgG)	40-50 zile	Idem

Pe baza acestei dinamici a markerilor HIV, infecția se clasifică în următoarele stadii:

- Perioada de “eclipsă” (sau de “fereastră serologică”) – interval inițial (după infecție) în care nu se decelează niciun marker HIV în ser
- Perioada de seroconversie – intervalul între infecția HIV și apariția primilor anticorpi detectabili; durata acestei perioade depinde de tipul de teste folosite pentru testare și de sensibilitatea acestora
- Infecția acută – intervalul între apariția ARN-HIV detectabil și pozitivarea testelor de detecție a anticorpilor specifici; durata acestei etape depinde de asemenea de tipul de teste folosite și de sensibilitatea acestora.
- Infecția HIV instituită (cronică) – acest stadiu se caracterizează printr-un raspuns deplin în anticorpi de tip IgG detectați prin ELISA și confirmați prin test Western blot.

Principalele teste incluse în algoritmul de diagnostic sunt testele ELISA, Western blot și testele de încărcare virală (de cuantificare a viremiei).

1. **Testele ELISA** detectează anticorpii anti HIV1 și/sau HIV2 (teste de generația I, II, III) și antigenul p24 al HIV1. În prezent sunt disponibile și teste combinate care oferă posibilitatea detecției concomitente a anticorpilor anti-HIV și a antigenului p24 al HIV1. Testele ELISA, chiar cele de generația I și II, au o sensibilitate bună în infecția HIV instituită (cronică) însă pot să nu detecteze infecții recente aflate în perioada de “eclipsă” sau “fereastră serologică” în care persoana infectată poate prezenta un nivel ridicat al viremiei HIV, cu urmări nefaste în ceea ce privește transmiterea infecției.

2. **Testele Western Blot** sunt utilizate pentru confirmarea testelor repetat pozitive prin ELISA. De menționat ca în cazul testelor ELISA combinate care decelează anticorpii anti-HIV 1&2 concomitent cu detecția antigenului p24 al HIV 1, confirmarea prin Western blot nu mai este necesară.

3. **Testele de încărcătură virală** (masurarea nivelului viremiei) cuantifică nivelul HIV în sânge. De obicei sunt utilizate pentru a monitoriza efectele tratamentului sau pentru diagnosticul precoce al infecției HIV. Sunt utilizate trei tipuri de tehnologii:

a. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) – este o aplicație care combină tehnologia PCR cu revers-transcripția, proces care implică acțiunea unor enzime numite revers-transcriptaze care realizează conversia secvențelor de ARN în secvențe de ADN complementar (ADNc) care sunt apoi amplificate și identificate prin PCR.

b. branched DNA (bDNA) – se bazează pe oligonucleotide “de captură”, sintetizate astfel încât să aibă secvențe complementare cu regiuni ale ARN-HIV și care astfel se vor hibridiza la aceste regiuni fixând ARN-HIV la un suport solid.

c. nucleic acid sequence-based amplification assay (NASBA) este o tehnică bazată pe amplificarea materialului genetic la temperatura constantă (41°C) sub acțiunea a 3 enzime (o ARN-ază, o revers-transcriptază și o ARN-polimerază).

Având în vedere necesitatea de a depista cât mai precoce persoanele infectate cu HIV, încă de la descoperirea acestui virus în 1985, a existat interes pentru realizarea de teste rapide, efectuate din salivă. Aceste teste au la baza faptul ca anticorpii anti-HIV sunt decelabili și în salivă, deși concentrația lor în acest produs biologic este mult mai scăzută decât în sânge, iar nivelurile sunt fluctuante, ceea ce afectează sensibilitatea. Cu toate acestea, cercetările au continuat în vederea optimizării testelor din salivă care prezintă avantaje legate de recoltarea mai facilă a probelor și invazivitate redusă.

În prezent, orice test salivar pozitiv necesită confirmare prin tehnicile menționate mai sus. Conform CDC, detecția precoce este cheia întreruperii transmisiei HIV deoarece tratamentul antiretroviral instituit precoce reduce rata transmiterii și scade riscul complicațiilor infecției HIV cum ar fi pneumoniile cu germeni oportuniști și tuberculoza.

Cercetătorii de la Stanford University au raportat recent efectuarea unor studii preliminare pentru un nou test HIV din salivă care poate decela niveluri scăzute de anticorpi anti-HIV folosind antigene virale atașate la ADN care este apoi amplificat și detectat cu ajutorul echipamentelor standard (PCR). Autorii afirmă că noul test va fi de 1000 de ori sau chiar de 10.000 ori mai sensibil decât actualele teste din salivă.

## Bibliografie selectivă

1. **Angelescu M.** Terapia cu antibiotice. Editura Medicală, București, 1998
2. **Bartlett JG, Auwaerter PG, Pham PA.** Johns Hopkins ABX Guide: Diagnosis & Treatment of Infectious Diseases, 2nd Edition. Jones & Bartlett Publishers, 2010
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. **Chevaliez S.** Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 116–121
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty third informational supplement, CLSI Document M100-S23. Wayne PA: CLSI; 2013
9. **Cornett JK, Kirn TJ.** Laboratory Diagnosis of HIV in Adults: A Review of Current Methods. Clinical Infectious Diseases 2013;57(5):712–8
10. **Debeleac L, Popescu-Drânda MC.** Microbiologie. Ed Medicală AMALTEA, București, 2003
11. **Elliot T, Hastings M, Desselberger U.** Medical Microbiology. Third Edition. Blackwell Science Ltd. 1997
12. **Fearon M.** The laboratory diagnosis of HIV infections, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 16 No 1 January/February 2005
13. **Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, et al.** EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance 2013;Version 1.0:4-10
14. **Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF.** Medical Microbiology. Fifteenth Edition. Churchill Livingstone, 1998
15. **Greenwood D.** Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press, 1989
16. **Grosjean J, Clave D, Archambaud M, Pasquier C.** Bactériologie et Virusologie pratique. De Boeck Supérieur, 2017
17. **Jarlier V.** Enterobacteries et  $\beta$  lactamines, L'antibiogramme. MPC Vigot 1985, 87-101
18. **Jehl F, Chomarat M, și colab.** De la antibiogramă la prescripție. Ediția a II-a. Editura Științelor Medicale, București, 2003
19. **Licker M, Moldovan R, Crăciunescu M, Dumitrașcu V.** Rezistența la antibiotice - istorie și actualitate. Editura Eurostampa, Timișoara, 2002
20. **Licker M, Moldovan R și colab.** Curs de Microbiologie specială Vol I, Bacteriologie, Lito UMF, Timișoara 2013
21. **Moldovan R și colab.** Lucrări practice de Microbiologie, Editura Victor Babes Timisoara 2013, ISBN 978-606-6456-19-5

22. **Lorian V.** Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams &Wilkins, 2005
23. **Mahon C, Manuseelis G.** Textbook of Diagnostic Microbiology. Second Edition. W.B. Saunders Company, USA, 2000
24. **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone, 2010
25. **McPherson RA, Pincus MR.** Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-first Edition. Saunders Elsevier, USA, 2007
26. **Mims CA, Dockrell HM, Goering RV, et al.** Medical Microbiology. Third Edition. Mosby-Year Book Europe Limited, 2006
27. **Moldovan R, Licker M.** Curs de Microbiologie specială Vol II, Micologie și Virusologie, Lito UMF, Timișoara 2013
28. **Moldovan R, Licker M, Doroiu M și colab.** Microbiologie-Îndreptar de lucrări practice. Lito U.M.F. Timișoara, 2002
29. **Pilly E.** Maladies Infectieuses, APPIT, 12Edition, Montmorency, 1992
30. **Poiată A.** Microbiologie farmaceutică. Ed. Tehnică, Științifică și Didactică CERMI, Iași, 2004
31. **Schäffler A, Altekrüger J.** Microbiologie Medicală și Imunologie. Editura ALL, București, 1994
32. **Vandepitte J, Engbaeck K, Piot P, Heuck CC.** Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire. O.M.S., Genève, 1994
33. **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
34. **Zarnea G.** Tratat de Microbiologie Generală – volumul III. Editura Academiei R.S.R., 1986
35. <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations Published June 27, 2014
36. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/127/investigations> Hepatitis B
37. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/128> Hepatitis C
38. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/555/investigations> HIV infections
39. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/6/investigations> Influenza infection
40. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-us/126/investigations> Hepatitis A
41. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations
42. [www.mdpi.com/journal/viruses](http://www.mdpi.com/journal/viruses) Vemula S.V., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S., Hewlett I., Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans Viruses 2016, 8, 96; doi:10.3390/v8040096
43. <https://www.sciencesource.com/archive/Neisseria-gonorrhoeae-SS2388346.html>
44. <http://www.msefans.com/cnsinfections/listeria.html>
45. [https://www.researchgate.net/figure/the-C-S-or-gull-wing-shape-of-Campylobacter-species-arrows-stained-by-1-Carbol\\_fig1\\_271214444](https://www.researchgate.net/figure/the-C-S-or-gull-wing-shape-of-Campylobacter-species-arrows-stained-by-1-Carbol_fig1_271214444)
46. [https://www.researchgate.net/figure/colonies-of-Campylobacter-species-grown-on-Preston-Agar-showing-translucent\\_fig3\\_271214444](https://www.researchgate.net/figure/colonies-of-Campylobacter-species-grown-on-Preston-Agar-showing-translucent_fig3_271214444)
47. [https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/images/H-pylori\\_100x\\_mag-01-bg-250.jpg](https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/images/H-pylori_100x_mag-01-bg-250.jpg)
48. [https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/v1-sld\\_H-pylori.html](https://med.nyu.edu/medicine/labs/blaserlab/v1-sld_H-pylori.html)

49. <http://www.scionpublishing.com/resources/medmicro/chap2/48.jpg>
50. <https://microbeonline.com/x-v-factor-test-haemophilus-principle-procedure-results/>
51. <https://www.cdc.gov/hi-disease/about/photos.html>
52. <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-c-difficile>
53. <http://examens-directs.over-blog.com/page-2946398.html>
54. <https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/gallery.htm>
55. (a) <https://www.arminlabs.com/en/tests/antibodies>
56. <https://twitter.com/JClinMicro/status/1060893117723918342>
57. <https://www.clinicord.com/wp-content/uploads/pdfs/genital.pdf>
58. <https://www.savyondiagnosics.com/product/quickstripe-chlamydia-ag/>
59. <https://www.biomerieux-usa.com/industry/air-ideal>
60. <https://www.slideshare.net/EugenTabac/31-prelevate-deseuri-medicale>
61. (a) <https://www.pinterest.com/source/blogs.wayne.edu/>, (b) CDC/ Dr. Frederick A. Murphy - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #1833; Public domain
62. <https://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations/>