



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA

Diana Uțu
Alina Jojić
Gabriela Antal
Cristiana Mabda
Mirela Voicu
Sergio Liga
Georgiana Stănuș

MICROBIOLOGIE MEDICALĂ

ÎNDREPTAR DE LUCRĂRI PRACTICE

GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE
DE LABORATOR

Editura „Victor Babeș”
Timișoara, 2026

Editura „Victor Babeș”

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

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

<https://www.umft.ro/ro/organizare-evb/>

Director: Prof. univ. dr. SORIN URSONIU

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. ADRIAN VLAD

Referent științific: Prof. univ. dr. CRISTINA DEHELEAN

© 2026 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 978-606-786-562-2

CUPRINS

I. ROLUL ȘI ORGANIZAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE MEDICALĂ	7
1. Dotarea materială a laboratorului de microbiologie	10
1.1. Încăperi adecvate	10
1.2. Instalații adecvate	11
1.3. Mobilier adecvat	11
1.4. Microscopae	11
1.5. Consumabile de laborator.....	12
1.6. Instrumentarul de laborator	12
1.7. Aparatura laboratorului de microbiologie	13
2.. Normele de protecție a muncii	16
II. STERILIZAREA	18
1. Introducere	18
2. Clasificarea metodelor de sterilizare	20
III. ANTISEPTICE	30
1. Dezinfecția	36
1.1. Dezinfecția prin mijloace chimice.....	37
IV. ETAPELE DIAGNOSTICULUI BACTERIOLOGIC	52
1. Recoltare	52
2. Examen macroscopic și microscopic	54
3. Izolarea bacteriilor din produsele patologice	54
4. Identificarea bacteriilor din produsele patologice	55
5. Medii de cultură	57
5.1. Clasificarea mediilor de cultură.....	58
5.1.1. Medii de cultură simple.....	59
5.1.2. Medii de cultură complexe.....	59
5.1.3. Medii de cultură speciale.....	59
V. METODE DE DIAGNOSTIC IMUNOLOGICE-SEROLOGICE UTILIZATE ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE	65
1. Noțiuni introductive	65
2. Reacții imunologice și serologice utilizate în diagnosticul de laborator al infecțiilor	68

2.1. Reacția de aglutinare	68
2.1.1. Activ/aglutinare directă	68
2.1.2. Aglutinare pasivă.....	69
2.1.3. Hemaglutinare	69
2.2. Reacția de precipitare.....	70
2.2.1. Imunodifuzia simplă radială (tehnica Mancini)	70
2.2.2. Imunodifuzia dublă (tehnicele Ouchterlony și Elek)	70
2.3. Tehnica ELISA.....	71
2.4. Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction – reacția in lanț a polimerazei).....	72
VI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL COCILOR GRAM POZITIVI ȘI GRAM NEGATIVI	75
1. GENUL <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	77
2. GENUL <i>STREPTOCOCCUS</i>	81
VII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE BACILI	89
1. GRAM POZITIVI AEROBI (GENUL <i>CORYNEBACTERIUM</i> , <i>LISTERIA</i> , <i>ERYSIPELOTHRIX</i>).....	89
1.1. Genul <i>Corynebacterium</i>	89
1.1.1. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	90
1.2. Genul <i>Listeria</i>	97
1.3. Genul <i>Erysiperlothrix</i>	103
VIII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>BACILLUS</i>	108
1. <i>Bacillus anthracis</i> și antraxul	109
IX. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN FAMILIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>.....	114
1. <i>Escherichia coli</i>	117
2. Genul <i>Salmonella</i>	122
3. Genul <i>Shigella</i> – caracteristici generale și importanță clinică	125
4. Genul <i>Klebsiella</i>	129
5. Genul <i>Proteus</i>	130
6. Genurile <i>Providencia</i> și <i>Morganella</i>	131
7. Genul <i>Yersinia</i>	132

X. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>VIBRIO</i>	138
1. <i>Vibrio cholerae</i>	140
2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	141
3. <i>Vibrio vulnificus</i>	141
XI. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>CAMPYLOBACTER</i> ȘI <i>HELICOBACTER</i>	142
1. Genul <i>Campylobacter</i>	142
2. Genul <i>Helicobacter</i>	146
XII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	150
XIII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>LEGIONELLA</i>	154
1. Genul <i>Legionella</i>	154
XIV. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL <i>HAEMOPHILUS SI PASTERURELLA</i>	158
1. Genul <i>Haemophilus</i>	158
2. Genul <i>Pasteurella</i>	161
XV. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENURILE <i>BORDETELLA, BRUCELLA SI FRANCISELLA</i>	164
1. Genul <i>Bordetella</i>	164
2. Genul <i>Brucella</i>	166
3. <i>Francisella Tularensis</i>	168
XVI. DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE GERMENI ANAEROBI	171
1. Protocolul diagnosticului de laborator în infecțiile produse de germeni anaerobi.....	171
2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de genul <i>Clostridium</i>	175
3. Diagnosticul de laborator al Germenilor anaerobi endogeni, nesporulați.....	181
XVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENI DIN GENUL <i>MYCOBACTERIUM</i>	185
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	185

2. <i>Mycobacterium leprae</i>	186
XVIII. <i>TREPONEMA PALLIDUM</i>. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI	188
XIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL <i>LEPTOSPIRA</i>.....	195
1. Diagnosticul de laborator al leptospirozei.....	196
XX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL <i>BORRELLIA</i>.....	199
XXI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE MICOPLASME	203
XXII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL <i>RICKETTSIA</i>.....	207
XXIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>.....	211
XXIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE VIRUSURI	215
XXV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE PARAZIȚI.....	257
XXVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE FUNGI	268
Bibliografie.....	293

I. ROLUL ȘI ORGANIZAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE MEDICALĂ

Laboratorul de microbiologie medicală reprezintă o componentă esențială a sistemului sanitar, funcționând ca unitate publică, cu sau fără personalitate juridică, care oferă servicii medicale prin examinarea probelor biologice de origine umană. Aceste servicii au ca scop confirmarea diagnosticului, alegerea tratamentului antimicrobian adecvat și monitorizarea evoluției terapeutice.

Pentru a asigura acuratețea și fiabilitatea rezultatelor, laboratorul trebuie să fie organizat riguros și echipat corespunzător, beneficiind de un sistem de management care să garanteze că mediul de lucru nu influențează negativ calitatea analizelor.

Activitatea laboratorului constă în identificarea și studiul microorganismelor patogene sau saprofite prezente în probele patologice. Diversitatea microorganismelor investigate – bacterii, virusuri, ciuperci, paraziți – a condus la dezvoltarea unor specializări distincte: bacteriologie, virusologie, parazitologie, micologie, serologie etc. Fiecare dintre acestea răspunde unor nevoi diagnostice specifice și contribuie la o înțelegere mai detaliată a proceselor infecțioase.

Laboratorul de microbiologie trebuie amplasat într-o zonă sigură și izolată, prevăzută cu compartimente separate pentru diverse activități, în vederea prevenirii contaminării încrucișate și a asigurării siguranței personalului și a materialelor utilizate.

Funcțiile laboratorului de microbiologie medicală

Laboratorul joacă un rol crucial în:

- stabilirea diagnosticului etiologic al infecțiilor;
- identificarea agentului patogen implicat;
- alegerea celei mai eficiente terapii antimicrobiene;
- monitorizarea eficienței tratamentului;
- detectarea purtătorilor asimptomatici de agenți patogeni.

În cadrul unităților spitalicești, laboratorul contribuie semnificativ la supravegherea continuă a infecțiilor nosocomiale, având un impact direct asupra calității actului medical și siguranței pacienților.

Particularități în mediul universitar

Laboratorul de microbiologie din cadrul instituțiilor de învățământ superior are atribuții extinse, care includ:

- centralizarea și analiza datelor privind rezistența bacteriană;
- efectuarea testelor de precizie în vederea elucidării mecanismelor genetice de transmitere a rezistenței antimicrobiene.

Aceste activități contribuie la fundamentarea politicilor de utilizare rațională a antibioticelor și la formarea viitorilor specialiști în domeniu.

Rolul echipei medicale

Activitatea eficientă a laboratorului presupune colaborarea strânsă între diverse categorii de specialiști:

- **Medicul microbiolog** trebuie să dețină cunoștințe aprofundate despre biologia agenților patogeni, fiziologia și patologia umană, pentru a putea realiza un diagnostic microbiologic corect și pentru a orienta deciziile terapeutice.

- **Medicul clinician** trebuie să posede noțiuni solide de microbiologie, pentru a înțelege valoarea rezultatelor furnizate de laborator și a le integra corect în contextul clinic al pacientului.
- **Personalul mediu calificat** are responsabilitatea de a efectua analizele de laborator cu rigurozitate, asigurând identificarea corectă a germenilor patogeni din probele prelevate.

Condiții esențiale pentru eficiența laboratorului

Pentru ca laboratorul de microbiologie să funcționeze la parametri optimi, sunt necesare următoarele condiții:

- Competența profesională a întregii echipe medicale;
- Colaborarea interdisciplinară între microbiologi, epidemiologi și clinicieni;
- Dotarea materială corespunzătoare, care să permită utilizarea metodelor moderne de identificare și testare a sensibilității agenților patogeni.

Un diagnostic microbiologic precis și o strategie terapeutică eficientă se pot obține doar printr-o colaborare constantă între toate specialitățile implicate. Această abordare integrată contribuie nu doar la vindecarea pacientului, ci și la prevenirea fenomenului de rezistență bacteriană, una dintre marile provocări ale medicinei moderne.

1. Dotarea materială a laboratorului de microbiologie

Acesta este un aspect fundamental în realizarea unei activități de laborator de microbiologie eficiente și precise.

O dotare materială adecvată, care include spațiul de lucru, echipamentele și instrumentele necesare, este importantă pentru a se asigura condiții optime de prelucrare a probelor și obținerea rezultatelor corecte.

Un laborator bine dotat poate influența în mod direct calitatea serviciilor medicale oferite pacienților și eficacitatea tratamentului.

Acesta trebuie să cuprindă următoarele componente:

1.1. Încăperi adecvate

Într-un laborator de microbiologie, spațiul adecvat este esențial pentru asigurarea condițiilor optime de lucru și prevenirea riscurilor de contaminare.

Încăperile necesare sunt:

- camera pentru primirea și înregistrare a probelor,
- camerele de lucru cu boxă sterilizată,
- camera pentru prepararea mediilor de cultură,
- camera pentru spălarea recipientelor,
- camera de sterilizare, depozitul de materiale, depozitul de reactivi și medii de cultură (sau camera frigorifică) și grupul sanitar.

Aceste încăperi trebuie să fie construite și dotate în mod corespunzător pentru a asigura siguranța și eficiența activității laboratorului.

1.2. Instalații adecvate

Pentru a asigura condiții optime de lucru și a preveni riscul de contaminare, printre acestea se numără:

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

Aceste instalații sunt esențiale pentru funcționarea corectă a echipamentelor și instrumentelor laboratorului, precum și pentru întreținerea mediilor de cultură și efectuarea procedurilor de laborator.

1.3. Mobilier adecvat

Un laborator de microbiologie necesită un mobilier adecvat pentru a asigura condiții optime de lucru și pentru a facilita activitățile laboratorului.

Printre cele mai importante elemente de mobilier se numără:

- mesele de lucru placate cu un material lavabil, neabsorbant și rezistent la acțiunea agenților dezinfectanți, ușor de curățat și dezinfectat. Aceste mese pot fi prevăzute cu sertare pentru o mai bună organizare;
- dulapuri pentru materialul steril, reactivi și coloranți, care să asigure stocarea și manipularea acestora în mod sigur și eficient;
- scaune.

1.4. Microscopie

Microscopul este un element fundamental al laboratorului, fiind utilizat pentru observarea și identificarea microorganismelor. Laboratorul trebuie să fie dotat cu microscopie performantă, cum ar fi cele cu fond luminos, cu fond întunecat, cu contrast de fază și cu lumină UV, care permit realizarea unei diagnoze precise și rapide.

1.5. Consumabile de laborator

Dotarea materială a laboratorului de microbiologie include un set de consumabile necesare pentru efectuarea analizelor și procedurilor de laborator.

Printre acestea se numără:

- lame pentru microscopie,
- eprubete de diferite dimensiuni,
- pipete gradate și automate,
- tuburi de sticlă pentru confecționarea pipetelor Pasteur,
- baloane, flacoane, cilindri gradați, pahare specifice laboratorului de bacteriologie,
- tuburi de centrifugă,
- baghete de sticlă și plăci petri pentru cultivarea produselor patologice.

Aceste consumabile sunt esențiale pentru realizarea experimentelor și pentru obținerea rezultatelor corecte în cadrul laboratorului de microbiologie.

1.6. Instrumentarul de laborator

Instrumentarul de laborator în microbiologie este foarte divers și cuprinde echipamente și instrumente necesare pentru efectuarea diferitelor proceduri și experimente.

Printre acestea se numără:

- becuri de gaz pentru flambare,
- anse bacteriologice calibrate pentru însămânțare și repicări,
- lupe și lupi binoculare pentru studierea caracterelor culturale,
- pense, foarfece și alte instrumente pentru operații practice,
- truse și baie de coloranți pentru colorarea frotiurilor, recipiente și containere pentru colectare, ambalarea și eliminarea deșeurilor.
- seringi de plastic pentru administrarea de culturi.

Toate aceste instrumente sunt esențiale pentru a asigura funcționarea corectă a laboratorului, prevenind riscurile de contaminare și accidente.

1.7. Aparatura laboratorului de microbiologie

Printre echipamentele principale se numără:

- autoclavele care sterilizează obiectele prin căldură umedă și sub presiune,
- pupinelul sau cuptorul cu aer cald pentru sterilizarea sticlăriei și altor obiecte,
- filtrele sterilizante pentru lichidele care nu suportă temperaturi înalte,
- lămpile bactericide cu UV pentru sterilizarea suprafețelor și aerului,
- termostatele care mențin o temperatură constantă,
- termostate cu CO₂ pentru izolarea bacteriilor, deoarece acestea se dezvoltă optim în această atmosferă, (există termostate speciale care creează condiții de anaerobioză, necesare pentru anumite procedee de lucru),
- frigiderele sunt esențiale într-un laborator, pentru a păstra la temperatura de 4°C diverse produse biologice, cum ar fi produsele destinate examenului microbiologic, mediile de cultură, antibioticele, vaccinurile sau chiar culturi microbiene,
- congelatoarele cu CO₂ solid sau azot lichid sunt considerate cea mai elegantă metodă de păstrare a tulpinilor microbiene în laborator, întrucât acestea realizează o temperatură de -78°C, ceea ce permite conservarea tulpinilor microbiene fără a le pierde viabilitatea.

De asemenea, congelatoarele obișnuite, care nu depășesc temperatura de -12°C, sunt doar adecvate pentru conservarea serurilor, dar nu și a microorganismelor,

- liofilizatorul este un echipament important în laboratoarele de microbiologie, care permite conservarea tulpinilor microbiene prin uscarea rapidă și bruscă a apelor din mediul de cultură la temperatură criogenică, în vid, la -78°C , acest proces de liofilizare permite păstrarea viabilității tulpinilor microbiene pe perioade lungi de timp, fără a necesita întreținere specială sau refrigerare,
- Baia-Marie este un aparat de laborator care permite menținerea unei temperaturi constante și controlată a unui mediu, adesea în cadrul unui sistem de cultură a microorganismelor. Acest aparat este compus dintr-un vas de sticlă sau metal, cu un material de izolare termică și este dotat cu un sistem de căldură și răcire care permite menținerea unei temperaturi precise și constante. Baia Marie este încălzită electric sau termic și permite întreținerea unei temperaturi precise între 30°C și 100°C . Este utilizată pentru sterilizarea instrumentelor, pentru menținerea temperaturii optime în timpul reacțiilor chimice sau biologice și pentru pregătirea mediilor de cultură,
- se poate găsi și o linie completă de analizor ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) care permite o varietate foarte largă de diagnostice microbiologice și imunologice.
- centrifuga, un alt instrument esențial în laboratorul de microbiologie, care permite sedimentarea și separarea componentelor dintr-un produs sau cultură. Cu o viteză de 3000 rot/min , pot efectua operațiuni de centrifugare cu mare succes, ajutând la separarea bacteriilor și a altor elemente celulare,
- într-un laborator de microbiologie, balanțele sunt instrumente esențiale pentru măsurarea cu precizie a cantităților de substanțe și materiale necesare pentru procedeele de laborator.

Acestea sunt:

- ✓ balanțe tehnice: utilizate pentru măsurarea cantităților mai mari, până la 10 kg, cum ar fi materiile prime sau reactivii;
- ✓ balanțe farmaceutice: necesare pentru măsurarea cantităților exacte de medicamente, substanțe chimice sau alte produse farmaceutice;
- ✓ balanțe analitice: utilizate pentru măsurarea cantităților extreme mici de substanță, cum ar fi suplimente, medii de cultură, care necesită o precizie ridicată;
- calculatoarele și sistemele de înregistrare respectiv de stocare a datelor sunt esențiale în laboratorul de microbiologie pentru a urmări evoluția și a detecta modificări în sensibilitatea tulpinilor la antibiotice, astfel încât să se poată lua decizii informate privind tratamentul și monitorizarea rezistenței la antibiotice la nivel local și global,
- materiale comune utilizate într-un laborator cum ar fi:
 - ✓ creioane de scris pe sticlă,
 - ✓ hârtie pentru notițe, înregistrări și documentație,
 - ✓ detergenți pentru curățarea echipamentelor și a suprafețelor,
 - ✓ dezinfectanți pentru sterilizarea și dezinfectarea suprafețelor,
 - ✓ săpun lichid pentru spălarea mâinilor și curățarea pielii,
 - ✓ prosoape de hârtie pentru curățarea scurgerilor și ștergerea suprafețelor.

Toate aceste echipamente sunt importante pentru prevenirea contaminării și asigurarea siguranței în timpul lucrărilor de laborator.

2. Normele de protecție a muncii

Principalele norme din laborator includ:

- purtarea de echipament de protecție: halat, mănuși, capelină, mască și botoși;
- în laborator, nu se mănâncă, nu se bea și nu se fumează;
- materialele sterile și cele contaminate se manipulează în condiții aseptice pentru a evita contaminarea suprafețelor de lucru, a mediilor de cultură sau infectarea persoanelor care lucrează;
- ușile de acces în laborator trebuie să fie închise după folosire;
- dezinfectarea frecventă a suprafețelor și instrumentelor;
- utilizarea unui corp de încălzire pentru a menține temperatura corespunzătoare în laborator;
- ansa bacteriologică se sterilizează prin încălzirea până la roșu în flacăra;
- pipetele gradate și pipetele Pasteur se pun în vase cilindrice cu soluție sulfocromică după utilizare;
- baloanele, eprubetele și plăcile Petri cu produse biologice sau culturi bacteriene neutilizate se pun în recipiente speciale în vederea sterilizării;
- echipamentul contaminat se dezinfectează cu soluții adecvate pentru a preveni răspândirea infecțiilor;
- dezinfecția suprafețelor de lucru (se acoperă masa de lucru cu o soluție dezinfectantă, se lasă să acționeze 5-10 minute, apoi se spală cu apă și detergent);
- spălarea mâinilor (se spală frecvent cu apă și săpun, operațiune obligatorie și la sfârșitul programului de lucru);
- închiderea surselor, înainte de părăsire a laboratorului, se vor închide sursele de apă, gaz și curent electric.

În concluzie, laboratorul de microbiologie medicală reprezintă o componentă esențială a sistemului de sănătate, fiind responsabil pentru identificarea și caracterizarea microorganismelor patogene.

Laboratorul de microbiologie medicală are ca scop principal stabilirea diagnosticului, tratarea bolilor infecțioase, precum și monitorizarea evoluției bolilor și a eficacității tratamentului.

Un laborator bine echipat și un personal calificat sunt esențiale pentru realizarea analizelor și a determinărilor corecte, asigurând astfel o mai bună gestionare a patologiilor infecțioase și reducerea riscurilor pentru pacienți.

II. STERILIZAREA

Definiție

Sterilizarea este definită ca un proces de eliminare completă sau distrugere a tuturor formelor de viață microbiană (atât formele vegetative cât și cele sporulate), realizată prin diferite metode fizice și chimice.

1. Introducere

Tehnic, sterilizarea implică o reducere $\geq 10^6$ log unități formatoare de colonii (UFC) ale celor mai rezistenți spori, realizată la jumătatea unui ciclu regulat.

Acest lucru asigură distrugerea completă a agenților patogeni și eliminarea oricărui risc de contaminare.

Sterilizarea a avut un impact semnificativ în domeniul medical, aducând beneficii majore în chirurgie, epidemiologie, igienă și alte specialități medicale.

Această tehnică de eliminare a germenilor viabili, este esențială pentru prevenirea infecțiilor.

Importanța sterilizării constă în capacitatea sa de a distruge microorganismele și de a preveni recontaminarea obiectelor sterilizate, iar alegerile metodei de sterilizare trebuie făcute având în vedere sensibilitatea microorganismelor și caracteristicile materialelor.

Nivelul de dezinfecție sau de sterilizare necesar pentru dispozitivele medicale și instrumentele chirurgicale este determinat de utilizarea prevăzută a acestora, articolele critice necesitând sterilizare, articolele semicritice necesitând dezinfecție de nivel înalt, iar articolele necritice necesitând dezinfecție de nivel scăzut. Indiferent de nivelul de dezinfecție necesar,

curățarea temeinică a echipamentului înainte de dezinfectare sau sterilizare este esențială pentru a elimina în mod eficient materialul organic și resturile care ar putea interfera cu procesul de dezinfecție ulterior.

Metodele de curățare corespunzătoare, combinate cu niveluri adecvate de dezinfecție sau sterilizare, contribuie la asigurarea siguranței pacienților prin reducerea riscului de infecții asociate asistenței medicale.

Aceste grade de rezistență ale microorganismelor la căldură umedă sunt importante deoarece determină durata și condițiile necesare pentru a le distruge complet.

Microorganismele ca bacterii vegetative, ciuperci și virusuri prezintă un grad de rezistență mai scăzut și pot fi distruse rapid la temperaturi în jur de 100°C în medii apoase. În schimb, sporii bacteriilor din genurile *Bacillus* și *Clostridium* prezintă o rezistență mai mare la căldura umedă, necesitând temperaturi și timp de expunere mai mari pentru a fi distruși. Este important să se țină cont de aceste diferențe de rezistență în industria alimentară, medicală sau în alte domenii unde igiena și siguranța sunt prioritare. Alegerea antisepticelor și dezinfectanților trebuie făcută astfel încât aceștia să fie eficienți împotriva microorganismelor existente, având în vedere că sporii sunt mai rezistenți decât formele vegetative ale bacteriilor.

În procesul de sterilizare, este important să fie respectate regulile generale, precum interzicerea reutilizării dispozitivelor de unică folosință, curățarea și dezinfectarea prealabilă a materialelor medicale, precum și organizarea adecvată a activităților de sterilizare pentru a asigura separarea circuitelor sterile de cele nesterile.

Stația centrală de sterilizare trebuie amenajată într-un spațiu dedicat, cu o separare clară între circuitul steril și cel nesteril.

2. Clasificarea metodelor de sterilizare

A. Metode fizice

- a) sterilizarea prin căldură umedă – la autoclave,
- b) sterilizarea prin căldură uscată – la pupinel / etuvă.

B. Metode fizico-chimice

- a) sterilizarea cu oxid de etilenă,
- b) sterilizarea cu plasmă.

A. Metode fizice

a) Sterilizarea prin căldură umedă în cadrul unui autoclav

Acest proces de sterilizare utilizează abur sub presiune pentru a distruge microorganismele, fiind extrem de eficient în eliminarea agenților patogeni, inclusiv bacterii, virusuri și spori, de pe diverse instrumente medicale, echipamente și materiale de laborator. Metoda garantează un nivel ridicat de siguranță și protecție împotriva infecțiilor asociate utilizării acestora. Sterilizarea se efectuează la o temperatură de 121°C, timp de 30 de minute, sub o presiune de 1 atmosferă.

Această metodă este indicată pentru sterilizarea materialului infecțios din laborator:

- medii de cultură, tampoane de vată,
- obiecte din cauciuc (sonde, dopuri, tuburi de dren),
- materiale din bumbac (tifon, vata, câmpurile operatorii sau halate).

Această metodă de sterilizare garantează distrugerea microorganismelor patogene și asigură siguranța în utilizarea acestor materiale în scop medical sau de laborator.

Autoclavele "flash" reprezintă o opțiune populară în sălile de operație datorită rapidității și eficacității lor în sterilizare. Sterilizarea la 134°C timp de 4 minute elimină în mod eficient microorganismele, iar eliminarea mecanică a aerului și vaporilor de apă optimizează procesul.

Respectarea instrucțiunilor producătorului, inclusiv valorile de presiune, temperatură și timp specificate în manualul tehnic al aparatului de sterilizare, este esențială pentru a asigura o sterilizare eficientă a diferitelor tipuri de materiale și pentru a garanta siguranța pacienților.

b) Sterilizarea prin căldură uscată la pupinel sau etuvă

Această procedură se realizează la temperaturi de 180°C timp de o oră sau la 160°C timp de două ore, proces care asigură distrugerea formelor vegetative și a sporilor tuturor microorganismelor prin carbonizare. Temperaturile ridicate sunt necesare deoarece căldura uscată pătrunde mai greu, iar obiectele sunt scoase din aparat după ce aerul din interior se răcește sub 100°C, pentru a evita contaminarea ulterioară.

Această metodă de sterilizare este indicată pentru diverse echipamente de laborator cum ar fi:

- eprubete, baloane, tuburi, pipete gradate, pipete Pasteur, cutii Petri, pâlnii sau pahare Berzelius,
- obiecte din porțelan cum ar fi mojarile sau capsulele,
- instrumentarul chirurgical și stomatologic,
- anumite pulberi precum talcul sau uleiurile (parafina).

Pupinelul este o metodă de dezinfectare chimică prin care se pot elimina microorganismele în mod eficient din echipamentele care nu pot fi sterilizate prin autoclavare sau alte metode termice. Este important de menționat că pupinelul nu este adecvat pentru sterilizarea anumitor tipuri de materiale precum:

- soluții apoase,

- obiecte din cauciuc,
- țesături și fibre din bumbac sau materialul contaminat din laborator datorită limitărilor sale în eliminarea tuturor agenților patogeni sau a sporilor rezistenți.

Procesul complet de sterilizare la pupinel constă în mai multe etape:

- încălzirea aparatului,
- faza de latență sau omogenizare pentru atingerea temperaturii de sterilizare, durata fiind în funcție de aparat, de natura și cantitatea materialului sterilizat,
- faza efectivă de sterilizare (la 180°C timp de o oră sau la 160°C timp de două ore),
- faza de răcire.

Durata totală a unui ciclu de sterilizare este de aproximativ 4-5 ore, cu timpul de sterilizare măsurat de la atingerea temperaturii de sterilizare în interiorul încărcăturii.

B. Metode fizico-chimice

a) Sterilizarea cu oxid de etilenă este o metodă fizico-chimică eficientă pentru distrugerea microorganismelor. Totuși, utilizarea acesteia necesită precauții speciale, datorită toxicității oxidului de etilenă și riscului de formare a unui amestec exploziv în contact cu aerul.

Oxidul de etilenă acționează asupra bacteriilor prin intermediul oxigenului din molecula sa, având capacitatea de a penetra rapid diverse materiale sintetice termoplastice la temperaturi relativ scăzute, între 20-60°C. Aceasta este o metodă versatilă pentru sterilizarea diferitelor echipamente și materiale medicale sensibile la căldură.

Este recomandată, pentru obiecte din material plastic ambalate ermetic în pungi de plastic, deoarece oxidul de etilenă pătrunde ușor în materialele

poroase și este eficient în distrugerea microorganismelor. Cu toate acestea, există riscuri de toxicitate pentru personalul care manipulează, de aceea această metodă trebuie folosită doar atunci când nu există alte opțiuni de sterilizare disponibile. Obiectele sterilizate trebuie aerisite adecvat pentru a elimina oxidul de etilenă rezidual și a preveni expunerea la substanțe toxice.

Utilizarea oxidului de etilenă este interzisă în următoarele cazuri:

- în cazul sterilizării materialelor medico-chirurgicale a căror compoziție este necunoscută sau în situații de urgență,
- la reesterilizarea echipamentului medical din policlorură de vinil sterilizat inițial cu radiații ionizante sau raze gamma,
- în încăperile unde se fumează, deoarece aceste condiții pot pune în pericol siguranța și sănătatea persoanelor expuse.

b) Sterilizarea cu plasmă cu gaz este o metodă inovatoare de sterilizare care folosește peroxidul de hidrogen ca agent sterilizant, fiind utilizată pentru sterilizarea echipamentului care nu poate fi sterilizat prin autoclavare. Această tehnologie oferă o soluție eficientă și sigură pentru sterilizarea instrumentarului medical sau a altor obiecte sensibile la căldură sau umiditate, asigurând un control strict al procesului de sterilizare.

Descrierea detaliată a plasmei ca a patra stare de agregare a materiei subliniază prezența ionilor, electronilor și particulelor neutre care interacționează electromagnetic și formează un mediu electric neutru la nivel microscopic. Plasmele pot fi totale sau parțial ionizate, cu proprietăți unice și temperaturi diferite pentru fiecare tip de particule. Inițierea stării de plasmă este influențată de mulți factori și nu poate fi definită o temperatură specifică pentru tranziția din stare gazoasă în cea de plasmă, cu conducție electrică și sensibilitate la câmpuri magnetice externe.

a. Pregătirea materialelor pentru sterilizare

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

1. Decontaminarea materialelor este o etapă esențială în procesul de sterilizare și prevenire a infecțiilor nosocomiale. Ea se efectuează imediat după utilizarea echipamentelor medicale și constă în imersia acestora într-o soluție de detergent -dezinfecțant pentru îndepărtarea murdăriei și sterilizarea acestora.

Recomandările pentru decontaminarea eficientă a materialelor și dispozitivelor medicale includ:

- evitarea contaminării mediului spitalicesc în timpul transportului acestora către zona de decontaminare,
- ștergerea atentă a articolelor care nu suportă imersia,
- utilizarea de produse detergent - dezinfecțante avizate de către Ministerul Sănătății,
- respectarea concentrației și timpului de acțiune recomandate de producător,
- eliminarea soluției decontaminante după utilizare,
- este important ca temperatura soluției să nu depășească 55°C pentru a evita precipitarea proteinelor,
- clătirea adecvată a materialelor după curățare și dezinfecțare pentru eliminarea rezidului de detergent-dezinfecțant,
- ustensilele folosite pentru pregătirea materialelor pentru sterilizare trebuie întreținute și curățate după fiecare operațiune inclusiv sfârșitul zilei de lucru,
- este important ca personalul care efectuează activitățile de curățare și dezinfecție să respecte măsurile de precauție necesare, inclusiv purtarea

echipamentului de protecție corespunzător, conștientizarea riscurilor la care sunt expuși, respectarea precauțiilor universale și cunoașterea în detaliu a dezinfectantului utilizat, inclusiv denumirea acestuia, data preparării soluției de lucru, concentrația și timpul de acțiune.

- 2. Uscarea** – este o metodă importantă în procesul de sterilizare a instrumentarului și dispozitivelor medicale, deoarece microorganismele nu pot supraviețui pe suprafețe uscate.

În acest sens, este important să se așeze instrumentarul pe grătare din material adecvat precum metal, lemn sau plastic pentru a permite facilitarea scurgerii și uscarea completă. De asemenea, este esențial să se folosească prosoape curate, fără scame pentru a preveni contaminarea ulterioară a instrumentelor sterilizate.

- 3. Asamblarea** – articolele care au fost demontate pentru curățare și dezinfectare trebuie asamblate cu grijă pentru a asigura funcționarea corectă și sigură a acestora.

Procedura de asamblare trebuie să fie riguroasă și să respecte instrucțiunile de utilizare pentru a evita eventualele probleme sau accidente.

- 4. Lubrifierea** – constă în aplicarea unui strat de lubrifianț pe părțile mobile ale instrumentarului sau echipamentelor medicale pentru a reduce frecarea și uzura acestora.

Acest proces asigură funcționarea corectă a articulațiilor și facilitează manevrabilitatea dispozitivelor, contribuind la prelungirea duratei de viață, evitând deteriorarea prematură.

5. Verificarea – reprezintă o etapă esențială în procesul de sterilizare a instrumentarului medical, asigurând că acesta a fost curățat corespunzător, nu prezintă defecte sau contaminări și este gata pentru sterilizare.

Se verifică integritatea instrumentarului, a pieselor demontate, a casoletelor și cutiilor metalice, iar apoi se procedează la sortarea și împachetarea seturilor de instrumente pentru a fi sterilizate.

6. Procesul de împachetare a instrumentarului și echipamentelor medicale în vederea sterilizării necesită utilizarea unor materiale adecvate precum hârtie specială sau pungi de hârtie/ plastic, fiecare fiind selectată în funcție de metodă de sterilizare utilizată.

Acest proces trebuie să respecte regulile și procedurile specifice, precum plierea corectă a materialului sau utilizarea de bandă adezivă cu indicator fizico-chimic pentru siguranță. Este important ca materialele de împachetare să fie utilizate o singură dată, pentru a asigura un nivel corespunzător de sterilizare. Utilizarea corectă a cutiilor metalice sau a altor recipiente perforate este, de asemenea, esențială în acest proces.

Procesul de sterilizare în cutii metalice perforate sau cu colier presupune introducerea materialului de sterilizat și a indicatorilor adecvați pentru controlul eficacității sterilizării, urmată de închiderea capacului și lipirea benzii adezive cu indicator chimic. Este important să se utilizeze doar cutii metalice în stare perfectă, perforate sau cu colier, pentru a asigura etanșeitatea și eficiența procesului de sterilizare la autoclav, iar utilizarea cutiilor metalice neperforate este interzisă.

b. Stocarea și menținerea sterilității materialelor după operațiunea de sterilizare

Toate aceste măsuri privind manipularea, stocarea și protejarea materialului sterilizat sunt deosebit de importante pentru menținerea sterilității acestuia și evitarea contaminării ulterioare.

Verificarea integrității ambalajelor, precum și respectarea condițiilor de stocare și manipulare sunt proceduri esențiale pentru menținerea sterilității materialelor medicale minimizând riscul de infecții asociate în cadrul unităților sanitare.

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

- cutii metalice perforate sau casolete cu colier pot fi păstrate timp de 24 de ore de la sterilizare, cu condiția ca acestea să rămână închise,
- materialele ambalate în pungi hârtie-plastic sudate pot fi folosite timp de 2 luni de la sterilizare, cu menținerea integrității ambalajului, cu excepția cazurilor în care producătorul specifică altă perioadă de valabilitate și cu menținerea condițiilor specificate de acesta,
- dispozitivele medicale și materialele sterilizate trebuie etichetate cu data, ora, sterilizatorul cu aer cald folosit și persoana responsabilă pentru sterilizare.

c. Controlul sterilizării

După finalizarea sterilizării în autoclav, se realizează controlul prin diverse metode de verificare precum:

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

Testul de verificare a penetrării aburului (testul Bowie & Dick)

Testul de verificare a penetrării aburului pentru autoclav, este esențial pentru a detecta prezența aerului rezidual periculos sau a gazelor inerte în camera de sterilizare (în special în autoclavele tip B – cu vid), care ar putea compromite eficiența procesului de sterilizare. Acest test sensibil folosește cerneală indicatoare care își schimbă culoarea în funcție de parametrii specifici ai sterilizării. O schimbare completă și uniformă a culorii indică o performanță adecvată.

Registrele aferente acestui test trebuie păstrate timp de minimum 6 luni și revizuite periodic de către serviciul de supraveghere a infecțiilor. Acest proces este esențial pentru a garanta condiții de sterilizare sigure și corespunzătoare în mediul medical.

Testul cu indicatorii fizico-chimici

Indicatorii fizico-chimici, cum ar fi bandelele, banda adezivă sau pungile cu markeri de culoare, sunt folosiți pentru controlul sterilizării și se plasează în fiecare pachet sterilizat pentru a fi verificate la deschidere.

Virarea culorii la acești indicatori arată eficiența sterilizării, iar absența acesteia indică faptul că materialul nu este sterilizat și nu poate fi utilizat. Este important de reținut că simpla virare a indicatorului nu este suficientă pentru a garanta sterilizarea corectă. Este necesară și înregistrarea detaliată a procesului într-un registru specific, care să includă informații despre condițiile de sterilizare, rezultatele indicatorilor, semnătura personalului responsabil și alte observații relevante pentru monitorizarea și asigurarea calității sterilizării.

Indicatorii biologici

Indicatorii biologici sunt reprezentați de strip-uri sau fișe impregnate cu spori bacterieni, care sunt plasate în interiorul autoclavelor sau altor echipamente de sterilizare pentru a verifica eficacitatea proceselor de sterilizare.

Strip-urile impregnate cu *Geobacillus stearothermophilus* sau *Bacillus atrophaeus* sunt folosite pentru a verifica eliminarea microorganismelor rezistente din echipamente și instrumente, asigurând un nivel adecvat de sterilizare în mediul medical.

Aceste teste biologice sunt esențiale pentru monitorizarea și validarea proceselor de sterilizare în diferite medii, utilizând diferite metode de sterilizare cum ar fi autoclavarea, sterilizarea cu plasmă sau sterilizarea cu aer cald.

Controlului bacteriologic al sterilizării la autoclav

Indicatorul biologic cu *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) este utilizat pentru controlul bacteriologic al sterilizării la autoclav, indicând îndeplinirea condițiilor esențiale pentru sterilizare corectă, cum ar fi temperatură, presiune și timp.

Acesta este plasat într-un ciclu normal de sterilizare la temperaturi specifice, iar la finalul procesului fiola se lasă să se răcească timp de 10 minute pentru a evita riscul de spargere. Aceste măsuri asigură eficacitatea procesului de sterilizare pentru eliminarea microorganismelor rezistente.

Controlului bacteriologic al sterilizării cu căldură uscată (etuvă/ pupinel)

se realizează cu indicatori biologici impregnați cu *Bacillus atrophaeus* (ATCC® 9372™) care trebuie plasați cel puțin doi în fiecare șarjă verificată, o dată pe săptămână se realizează un ciclu complet de sterilizare.

Cazurile de teste pozitive trebuie raportate imediat firmei pentru revizii tehnice. Dacă apar probleme tehnice sau rezultate neconforme repetate, echipamentul respectiv nu va mai fi utilizat până la remedierea problemelor. De asemenea, indicii biologici pozitivi trebuie sterilizați în termen de maxim 24 de ore de la identificare.

III. ANTISEPTICE

Reprezintă agenți care distrug sau inhibă creșterea și dezvoltarea microorganismelor pe țesuturile vii.

Antisepticele sunt distincte de antibiotice și dezinfectanți în ceea ce privește aplicarea și funcționalitatea lor, utilizate pentru a preveni infecțiile și contagiunea pe țesuturile vii, în timp ce antibioticele luptă împotriva bacteriilor din interiorul corpului iar dezinfectanții sunt utilizați pentru a decontamina obiectele cum ar fi suprafețele de lucru, mobilierul, echipamentele și instrumentele medicale, în scopul de a reduce riscul de infecții.

Acestea sunt substanțe care acționează bacteriostatic sau bactericid atunci când sunt administrate local, pe piele, mucoase sau pe plăgi. Ele reduc numărul de germeni, dar nu sterilizează complet zona.

Procesul de antisepsie se realizează prin mijloace chimice care sunt eficiente în combaterea infecțiilor. Asepsia se concentrează pe menținerea sterilității mediului înconjurător și a obiectelor pentru a preveni cu totul contactul microbial cu rănilor, incluzând măsuri de distrugere microbială.

Antisepticele sunt substanțe care se aplică pe țesuturile vii pentru a ucide sau a preveni dezvoltarea microorganismelor. Acestea sunt mai blânde și mai puțin susceptibile de a afecta țesuturile umane.

Antisepticele joacă un rol crucial în diverse practici medicale prin prevenirea infecțiilor și în menținerea igienei.

Ele acționează prinuciderea, inhibarea sau reducerea creșterii acestor microorganisme, ajutând la promovarea vindecării și la prevenirea complicațiilor ulterioare.

Antisepticele sunt un instrument esențial în mediile medicale pentru menținerea igienei și prevenirea infecțiilor.

Acestea sunt utilizate în diverse scopuri, cum ar fi spălarea mâinilor, dezinfectarea membranelor mucoase, curățarea pielii înainte de intervenții chirurgicale și tratarea infecțiilor pielii, gâtului și gurii.

Capacitatea lor de a distruge microorganismele dăunătoare joacă un rol esențial în asigurarea siguranței pacienților și în reducerea riscului de complicații în urma intervențiilor chirurgicale sau a infecțiilor.

Tipurile comune de antiseptice sunt:

- **Alcoolii** sunt utilizați în mod obișnuit ca antiseptice pentru dezinfectarea pielii datorită capacității lor de a distruge bacteriile.

Două exemple de alcooli care sunt utilizați în acest scop sunt **alcoolul etilic** și **alcoolul izopropilic**.

Aceste substanțe sunt eficiente în distrugerea microorganismelor dăunătoare de pe piele, ceea ce le face instrumente valoroase în prevenirea infecțiilor.

- **Compușii cuaternari de amoniu (QAC)** sunt o categorie de substanțe cu proprietăți antiseptice utilizate în mod frecvent în industria medicală.

Aceștia sunt eficienți în distrugerea microorganismelor și pot fi aplicați pe piele sau membrane mucoase înainte de intervențiile chirurgicale pentru a preveni infecțiile. Utilizarea lor este importantă pentru menținerea asepsiei și reducerea riscurilor de complicații post-operatorii.

- **Clorhexidina și alte biguanide** sunt un grup de compuși chimici utilizați în mod obișnuit ca antiseptici și dezinfectanți. Aceștia sunt cunoscuți pentru activitatea lor antimicrobiană cu spectru larg de acțiune împotriva bacteriilor, ciupercilor și virusurilor, ceea ce îi face o alegere populară în mediul sanitar pentru spălarea chirurgicală,

îngrijirea rănilor și dezinfectarea generală a suprafețelor. Sunt reprezentați de gluconat de clorhexidină și respectiv acetat de clorhexidină.

Biguanidele acționează prin întreruperea membranelor celulare ale microorganismelor, ceea ce duce la moartea acestora. În ciuda eficacității lor, utilizarea prelungită poate duce la toxicitate și reacții alergice la unele persoane, așa că este important să se folosească sub îndrumare adecvată și să se urmeze protocoalele de utilizare recomandate. Exemple de biguanide: Polihexanidă (PHMB), Alexidina.

- **Coloranții antibacterieni** sunt utilizați în dezinfecția pielii, pentru tratamentul rănilor și respectiv, în tratarea arsurilor.

Coloranții antibacterieni sunt reprezentați de:

- ✓ Hemisulfat de proflavină,
- ✓ Trifenilmetan,
- ✓ Verde strălucitor,
- ✓ Cristal violet,
- ✓ Violet de gețiană.

- **Clorul și hipocloriții** sunt utilizați pe scară largă pentru dezinfecția la nivelul pielii și curățare datorită proprietăților lor oxidante puternice, dar necesită o manipulare atentă pentru a evita riscurile pentru sănătate și mediu. Clorul gazos este toxic, fiind prezent în mod obișnuit în produsele de curățare, în timp ce hipocloriții, cum ar fi înălbitorul și produsele chimice pentru piscine, conțin ionul hipoclorit. Este reprezentat de **hipocloritul de sodiu**.

- **Compuși cu iod** se utilizează pentru dezinfecția pielii (inclusiv preoperator) și respectiv pentru tratarea rănilor. Este reprezentat de **povidonă iod**.

- **Peroxidul și permanganatii** se utilizează ca dezinfectant pentru piele, se pot utiliza pentru gargară în prepararea apei de gură. Sunt reprezentați de soluție de **peroxid de hidrogen, soluție de permanganat de potasiu și peroxid de benzoil**.
- **Derivați de fenol halogenat** utilizați în dezinfecția pielii, de asemenea sub formă de săpun și soluție medicamentoasă. Sunt reprezentați de **Clorocresol, Cloroxilenol, Clorofen**.

Derivații fenolici sunt utilizați în locul fenolilor datorită toxicității, potențialului carcinogenic și corozivității acestora. Soluțiile fenolice trebuie preparate periodic, concentrându-se de obicei între 2-5%, având un efect dezinfectant împotriva bacteriilor, fungilor și unor virusuri. Cu toate acestea, efectul poate fi diminuat pe suprafețe din cauciuc, lemn sau material plastic.

- **Derivați de chinolone** utilizați în dezinfecția pielii, pentru tratamentul rănilor.

Aceștia sunt reprezentați de:

- ✓ Sulfat de hidroxichinolină,
- ✓ Hidroxichinolină sulfat de potasiu,
- ✓ Diiodohidroxichinolină.

Diverși antiseptici care se utilizează pentru dezinfecția pielii, în tratarea rănilor. Sunt reprezentați de soluție apoasă cu acetat de argint.

Compușii de argint precum nitratul de argint și sulfadiazina de argint sunt cunoscuți pentru utilizarea lor în diverse tratamente, datorită proprietăților antimicrobiene puternice.

Azotatul de argint, cunoscut și sub numele de "piatra iadului" sau "lapis infernalis", a fost descris pentru prima dată în secolul al XVII-lea. A fost utilizat pentru prima dată în 1880 pentru prevenirea oftalmiei gonococice la nou-născuți și încă este utilizat astăzi pentru proprietățile sale antiseptice și astringente.

Este utilizat în tratamentul plăgilor, abceselor, prevenirea infecțiilor oculare la nou-născuți, cauterizarea negilor și sângerății.

Sulfadiazina de argint, pe de altă parte, este o substanță cu un efect puternic antibacterian. Are un spectru larg de acțiune și este utilizată pentru tratamentul și prevenirea infecțiilor, arsurilor, leziunilor de decubit, ulcerelor varicoase și leziunilor traumatice minore. Sulfadiazina de argint se dezintegrează la nivelul leziunii și eliberează ioni de argint care se leagă de ADN-ul bacterian, inhibând creșterea și multiplicarea celulelor bacteriene. A fost demonstrat că sulfadiazina de argint ameliorează rata supraviețuirii pacienților cu arsuri severe.

Printre preparatele care conțin sulfadiazina de argint se numără Dermazin 1%, care este utilizat pentru tratamentul diferitor tipuri de leziuni cutanate.

Antisepticele trebuie să îndeplinească următoarele specificații:

Atunci când se selectează antisepticele pentru tratamentul clinic al plăgilor, este esențial să se acorde prioritate produselor care elimină sau reduc în mod fiabil și eficient o gamă largă de agenți patogeni.

Obiectivul ar trebui să fie o antisepsie completă pentru a preveni infecțiile și a sprijini procesele optime de vindecare a plăgilor. În plus, trebuie să se ia în considerare minimizarea potențialului de dezvoltare a rezistenței, a reacțiilor alergice și a altor efecte adverse asociate cu antisepticul ales.

O abordare integrată care combină curățarea adecvată a plăgii, debridarea și utilizarea judicioasă a antisepticelor este esențială pentru gestionarea cu succes a plăgilor.

Terapia antiseptică are ca scop nu numai eliminarea microbilor, ci și promovarea vindecării rănilor prin efecte asupra proliferării și regenerării celulare.

Antisepticele sunt esențiale în prevenirea infecțiilor prin eliminarea microbilor dăunători de pe piele și de pe membranele mucoase. Este esențial ca antisepticele să fie eficiente împotriva unei game largi de agenți patogeni, inclusiv bacterii, ciuperci și viruși, fiind în același timp sigure pentru utilizarea regulată, pentru a evita orice efecte adverse asupra pielii sau a membranelor mucoase. Acest lucru asigură faptul că pot fi utilizați cu încredere în diverse medii de îngrijire a sănătății pentru a menține igiena și a preveni răspândirea infecțiilor. Un antiseptic eficient ar trebui să aibă o activitate antimicrobiană cu spectru larg de acțiune, care să acopere virușii, ciupercile și bacteriile rezistente la antibiotice, cum ar fi MRSA și VRE.

Acestea ar trebui să fie sigure pentru utilizare, să nu provoace reacții alergice sau toxicitate și, în același timp, să atingă concentrații antimicrobiene eficiente fără a promova rezistența.

Antisepticele ideale ar trebui să prezinte o citotoxicitate scăzută, o bună activitate antimicrobiană și compatibilitate cu vindecarea rănilor.

Indicele de biocompatibilitate (BI) ajută la selectarea antisepticului potrivit, indicând o activitate cu spectru larg și citotoxicitate scăzută.

Factori precum mediul plăgii și substanțele care interferează pot afecta eficacitatea antisepticelor, necesitând o analiză atentă pentru o utilizare adecvată în cazuri specifice.

Un antiseptic eficient și sigur în utilizare trebuie să îndeplinească următoarele criterii:

- ✓ Efect bacteriostatic / bactericid,
- ✓ A fi eficace în eliminarea microorganismelor, inclusiv bacteriilor, virușilor și fungiilor,
- ✓ Să fie stabil și să nu se degradeze rapid,

- ✓ Să fie sigur pentru utilizare pe piele umană și să nu provoace iritații sau alergii,
- ✓ Să fie ușor de aplicat și să nu necesite pregătire specială,
- ✓ Să fie compatibil cu materialele utilizate în medicină, cum ar fi stofele și plasticele,
- ✓ Să aibă un conținut scăzut de substanțe chimice periculoase și să nu emită vapori toxici,
- ✓ Să fie supravegheat și reglementat de autorități pentru a asigura siguranța utilizatorilor.

Un antiseptic care îndeplinește aceste criterii poate fi utilizat cu încredere în diferitele aplicații medicale și igienice.

1. Dezinfecția

Dezinfecția reprezintă un proces de tratare care distruge sau inactivează majoritatea microorganismelor patogene, exceptând sporii bacterieni. Cu alte cuvinte, această procedură poate elimina o mare parte dintre bacterii, virusuri și fungi, însă nu garantează îndepărtarea completă a sporilor bacterieni.

Dezinfecția este de obicei realizată prin utilizarea de substanțe chimice lichide.

Dezinfectanții joacă un rol important în prevenirea infecțiilor, fiind utilizați pentru a îndepărta microorganismele de pe piele și diverse suprafețe.

O dezinfecție eficientă, precedată de o curățare adecvată, implică utilizarea de germicide chimic compatibile. Substanțe biocide precum alcoolul, iodul și clorul sunt utilizate de mult timp datorită efectelor lor antimicrobiene.

Înțelegerea utilizării lor în spitale și case este importantă pentru a asigura eficiența acestor produse în crearea unui mediu sigur și sanitar.

Este important să subliniem complexitatea pe care o implică studiul eficienței dezinfectanților împotriva diferitelor microorganisme, în special a virusurilor. Riscurile potențiale asociate cu distrugerea capsidelor genomului viral, care duc la eliberarea de acizi nucleici infecțioși, ridică îngrijorări cu privire la strategiile generale de dezinfecție virală.

Dezvoltarea rezistenței la antiseptice și dezinfectanți, la fel ca în cazul antibioticelor, subliniază importanța utilizării dezinfectantului corect pentru a combate eficient agenții infecțioși.

Pentru a evalua în detaliu eficacitatea fiecărui dezinfectant, este esențial să se analizeze capacitatea de acoperire a acestora în mediul spitalicesc. Aceste cunoștințe pot ajuta unitățile sanitare să își adapteze protocoalele de dezinfecție pentru a asigura un control cuprinzător al agenților patogeni și menținerea unui mediu igienic atât pentru pacienți, cât și pentru personal.

1.1. Dezinfecția prin mijloace chimice

Conform Regulamentului UE privind biocidele, produsele biocide utilizate pentru dezinfecția în unitățile sanitare sunt încadrate în grupa principală I (dezinfecția umană și a suprafețelor în contact cu alimentele), incluzând tipurile de produs 1 și 2. În total, biocidele sunt clasificate în patru grupe principale: I – produse pentru dezinfecție umană și de suprafețe; II – conservanți; III – repelente și alte produse destinate controlului organismelor dăunătoare; IV – alte biocide cu scop specific.

- ✓ **Produsele biocide tipul 1** sunt utilizate pentru dezinfecția igienică a mâinilor și a pielii intacte.
- ✓ **Produsele biocide tipul 2** sunt folosite în diverse scopuri, cum ar fi dezinfecția suprafețelor, dezinfecția mâinilor a dispozitivelor medicale și a textilelor, atât prin imersie cât și la mașini automate. Aceste produse

sunt esențiale pentru menținerea igienei și prevenirea transmiterii de agenți patogeni în diverse medii, inclusiv în spațiile publice și de lucru.

Dezinfectantele sunt substanțe puternic agresive care au capacitatea de a distruge microorganismele (bactericide), dar pot fi folosite doar în exteriorul organismului uman, precum obiecte și instrumentar medical, pansamente, lenjerii, mobilier, spații interioare și produse biologice.

Procesul de dezinfecție poate fi realizat folosind mijloace chimice, fizice sau mecanice și are drept rezultat distrugerea completă a microorganismelor patogene, contribuind la sterilizarea mediului.

Aceste produse joacă un rol crucial în prevenirea și combaterea infecțiilor, asigurând un mediu sigur și curat pentru pacienți, personalul medical și vizitatori în unitățile sanitare.

Dezinfecția este un pas vital în îndepărtarea microorganismelor de pe suprafețe, echipamente, instrumente și alte articole similare.

Aceste obiecte pot fi dezinfectate pentru a elimina microorganismele periculoase și a reduce riscul de infecții, fiind clasificată în:

- ✓ dezinfecție de nivel scăzut;
- ✓ intermediar;
- ✓ înalt, în funcție de gama de microorganisme pe care le poate elimina.

Dezinfecția de nivel scăzut vizează formele vegetative ale bacteriilor, virusurile și ciupercile.

Dezinfecția de nivel intermediar reduce toate speciile de bacterii, virusuri (inclusiv cele învelite și neînvelite) și ciuperci.

Dezinfecția de nivel înalt merge un pas mai departe, abordând și sporii, oferind un proces de dezinfecție mai cuprinzător.

Pentru fiecare nivel se folosesc dezinfectanți diferiți:

- ✓ peroxidul de hidrogen, compușii de amoniu cuaternar, fenolii, glutaraldehida pentru dezinfecția de nivel scăzut;
- ✓ fenolii, iodoformul, alcoolii și compușii clorurați pentru dezinfecția de nivel intermediar;
- ✓ glutaraldehida, peroxidul de hidrogen, hipocloritul și acidul hipocloros pentru dezinfecția de nivel înalt.

Aceste diferențieri sunt utile pentru selectarea metodei potrivite, pentru a elimina în mod eficient diferite tipuri de microorganisme.

Este important să se aleagă corect nivelul de dezinfecție în funcție de situația și de riscurile specifice.

Este crucial ca spitalele să aleagă și să evalueze constant eficiența dezinfectanților, pentru a controla eficient agenții patogeni în mediile medicale. Fiecare tip de dezinfectant prezintă avantaje și limite specifice, evidențiind importanța verificărilor periodice, a instruirii adecvate și a respectării normelor, pentru a asigura un mediu curat și sigur atât pentru pacienți, cât și pentru personal.

Alcoolul

Este un antimicrobian comun și eficient, utilizat în mod obișnuit ca dezinfectant și antiseptic datorită proprietăților sale antimicrobiene.

Acțiunea sa de baza este pe deshidratarea celulelor, perturbarea membranei și coagularea proteinelor. Există mai multe tipuri de alcool, cum ar fi alcoolul etilic, alcoolul izopropilic și alcoolul metilic, fiecare cu propriile sale proprietăți și aplicații.

O soluție a 70% alcool etilic este considerată eficientă în uciderile microbilor și este adesea utilizată ca antiseptic pe piele. Alcoolul izopropilic

este preferat față de alcoolul etilic datorită faptului că este mai puțin toxic pentru piele. Alcoolul metilic este util pentru a dezinfecta cușetele de inoculare și termometrele clinice.

Alcoolul etilic și izopropil alcoolul sunt substanțe volatile și inflamabile, dar utilizate la concentrații de 70% (v/v) în soluție apoasă au proprietăți dezinfectante asupra formelor vegetative ale bacteriilor, ciupercilor și împotriva virusurilor cu înveliș lipidic. Ele nu au efect asupra sporilor.

Soluțiile de etanol 70% sunt utilizate pentru decontaminarea mâinilor, tegumentelor, suprafețelor de lucru ale meselor de laborator, hotelor de biosiguranță și pentru imersarea diferitelor instrumente chirurgicale, deoarece nu lasă nici un rezidu.

Această soluție este eficientă și sigură, dar este important să se asigure concentrații corecte și să se evite contactul direct cu piele și ochi.

Aldehidele sunt un tip de dezinfectant cunoscut pentru eficacitatea lor împotriva unei game largi de microorganisme.

Cele trei clase principale de dezinfectanți aldehidici includ:

- ✓ **formaldehida,**
- ✓ **glutaraldehida**
- ✓ **oftalaldehida**

Aceste substanțe chimice sunt utilizate în mod obișnuit pentru dezinfecția și sterilizarea la nivel înalt în mediile de asistență medicală datorită proprietăților antimicrobiene puternice și capacității lor de a inactiva virusurile, bacteriile și ciupercile. Cu toate acestea, ele pot fi dăunătoare dacă nu sunt utilizate în mod corespunzător și sunt cunoscute ca fiind iritante pentru piele și sistemul respirator.

Formaldehida

Formaldehida (formol) este un compus chimic a cărui formulă chimică este: HCHO.

Se găsește în mod obișnuit sub trei forme:

Formă solidă, de para-formaldehidă polimerică, care este un solid alb alcătuit dintr-un amestec de formaldehidă și apă.

Soluție, de 37%, cunoscută și sub numele de formalină, care este un amestec de formaldehidă și apă. Soluția este stabilizată cu 100 ml de metanol.

Forma gazoasă, care se produce prin încălzirea compusului la temperaturi de peste 20°C în medii cu umiditate relativă de peste 70%. În această formă, formaldehida este eficientă în distrugerea microorganismelor și a sporilor acestora.

Forma gazoasă a formaldehidei este utilizată pentru dezinfectarea spațiilor închise.

O soluție de 5% de formalină în apă poate fi, de asemenea, utilizată ca dezinfectant lichid. Utilizată ca sterilizant și dezinfectant clinic, are capacitatea de a acționa ca bactericid, virucid și sporicid, dar mai lent decât glutaraldehida. Cu toate acestea, se știe că formaldehida reacționează puternic cu acidul nucleic, fiind recunoscută ca având proprietăți cancerigene. Prin urmare, sunt necesare măsuri de precauție și echipamente de protecție personală adecvate pentru manipularea acestei substanțe.

Glutaraldehida este un dezinfectant aldehydic utilizat pe scară largă care prezintă proprietăți bactericide, sporicide, fungicide și virucide.

Concentrația de 2% dezinfectant este utilizată frecvent datorită efectului său asupra bacteriilor, fungilor și virusurilor.

De asemenea, dezinfectantul este benefic în contextul în care nu corodează metalele, putând fi folosit și pentru suprafețe metalice.

Este folosită în mod obișnuit la curățarea echipamentelor medicale, cum ar fi endoscoapele, datorită eficacității sale împotriva bacteriilor precum *E. coli* și *S. aureus*. Cu toate acestea, clătirea temeinică a echipamentului după dezinfectare este esențială pentru a evita complicații precum colita după proceduri de colonoscopie.

Oftalaldehida (OPA) este un dezinfectant puternic bactericid și sporicid, cu proprietăți similare cu cele ale glutaraldehidei. Utilizarea sa ca înlocuitor al glutaraldehidei în dezinfecția endoscoapelor este o opțiune viabilă și eficientă, deoarece poate oferi aceeași acoperire și eficacitate în eliminarea microorganismelor patogene. Fiind un agent dezinfectant mai rapid și mai puțin iritant, OPA poate fi o alegere preferată pentru anumite situații clinice.

Este important să se țină cont de instrucțiunile de utilizare și de siguranța pentru a asigura o dezinfecție adecvată a echipamentelor medicale.

Anilidele cunoscute pentru proprietățile lor antiseptice, nu sunt utilizate în mod obișnuit în mediul spitalicesc, din cauza acoperirii lor limitate împotriva bacteriilor gram-negative și a ciupercilor.

Biguanidele - clorhexidina este un produs antiseptic cu un spectru larg de acțiune, fiind eficace împotriva *E. coli*, *S. aureus* și *Mycobacterium*.

Diamidinele sunt compuși chimici eficienți în combaterea bacteriilor datorită capacității lor de a bloca procesele microbiene esențiale. În special în cazul bacteriilor precum *P. aeruginosa* și *Enterobacter cloacae*, aceste substanțe au demonstrat un efect antibacterian puternic, fiind folosite cu succes în tratamentul topic al rănilor pentru prevenirea infecțiilor și accelerarea vindecării. Utilizarea lor continuă în domeniul medical se datorează

proprietăților lor deosebite de combatere a bacteriilor rezistente la antibiotice și de creare a unui mediu favorabil pentru vindecarea rănilor.

Agenți de eliberare a halogenului

Agenții de eliberare a clorului, precum hipocloritul de sodiu, sunt esențiali pentru dezinfectarea eficientă a mediilor diverse, datorită capacității lor de a inactiva agenții patogeni precum bacteriile, virusurile și fungii. Aceste substanțe sunt extrem de puternice în oxidare și sunt utilizate în domeniile medicale, pentru a asigura un nivel ridicat de igienă și siguranță.

Hipocloritul de sodiu (NaOCl) - cunoscut și sub numele de înălbitor cu clor. Clorul este un oxidant puternic și rapid, cu un spectru larg de acțiune. Soluția este foarte alcalină și corozivă pentru metale, așa că este vândută de obicei sub formă de agent de albire și depozitată în recipiente închise.

Utilizată ca dezinfectant, soluția se prepară zilnic prin diluarea ei cu apă pentru a obține concentrații de clor între 1-5 g/l. La o concentrație de 70% Cl, se adaugă 7,0 g de hipoclorit pe litru de apă.

Hipoclorițul trebuie preparat periodic, deoarece devine inactiv după mai mult de 24 de ore.

Cloraminele sunt germicide chimice, care pot fi disponibile sub formă de pulbere și care conțin 25% clor; pentru decontaminare se utilizează dizolvarea a 20 g de Cloramin în 1 litru de apă, Soluția rezultată este inodoră și mai puțin afectată de materia organică, spre deosebire de soluțiile de hipoclorit.

Aceasta fiind eficientă atât împotriva suprafețelor curate, cât și a celor murdare, decontaminarea suprafețelor, deasemenea prezintă reducerea bacteriilor, virușilor și ciupercilor.

Dioxidul de clor (ClO₂) este un germicid puternic, cu acțiune imediată și activitate la concentrații mai joase decât cele ale hipocloritului. El se poate obține prin amestecarea de acid clorhidric și clorit de sodiu (NaClO₂), sau poate fi comandat sub formă de soluție apoasă stabilizată, care este activată în momentul folosirii.

De asemenea, dioxidul de clor este cunoscut pentru efectul său oxidant selectiv, reacționând în special asupra compușilor sulfurici, aminelor secundare și terțiare, și asupra altor compuși organici intens reduși. Această proprietate face din el un agent biocid important în domeniul decontaminării și dezinfectiei.

Clorhexidina: Un agent antibacterian cationic, cunoscut și sub numele de bisbiguanidă, care este utilizat ca antiseptic. Este disponibil în diverse forme, cum ar fi sărurile (de exemplu, clorură, diacetat și digluconat). Atunci când este utilizat ca dezinfectant, este recomandat pentru dezinfectarea pielii, a mâinilor și a membranelor mucoase (Hebisol 1%).

Agenții pe bază de iod.

Dezinfectanții iodați au o acțiune similară cu cea a clorului, dar sunt mai puțin inhibați de substanțele organice.

Iodul este un element chimic care are proprietăți antimicrobiene și se utilizează în medicină pentru a preveni infecțiile și a dezinfecta suprafețele. Iodul se dizolvă în soluții de etanol, eter, cloroform și benzen, formând soluții colorate, cum ar fi soluția Lugol.

Soluția Lugol este o soluție antiseptică care conține iod 1%, iodură de potasiu 2% și apă distilată. Această soluție este utilizată pentru a dezinfecta rănilor și zonele de piele afectate.

Iodul are proprietăți antimicrobiene care ajută la uciderile microbilor și a sporilor, fiind eficient împotriva multor tipuri de bacterii, virusuri și fungi. De asemenea, iodul are proprietăți antiinflamatoare și antipiretice, ceea ce face din el un agent important în medicină.

Cu toate acestea, au tendința de a păta suprafețele și țesăturile. Nu se recomandă utilizarea lor pe instrumente medicale, obiecte din aluminiu sau obiecte din cupru.

Povidona iodată este cel mai utilizat antiseptic din clasa compușilor halogenați cu iod.

Este utilizat clinic din 1956 și este disponibil sub diverse forme, inclusiv soluții, spray-uri, creme și unguente.

Concentrația de povidonă cu iod variază între 9% și 12%.

Soluțiile cu iod sunt utilizate în principal pentru îngrijirea rănilor, dar și pentru reducerea florei microbiene înainte și după intervențiile chirurgicale.

Formele semisolide (creme, unguente) sunt utilizate pentru a preveni răspândirea agenților patogeni la nivelul plăgii sau pentru a limita răspândirea infecțiilor localizate.

Utilizările povidonei iodate includ:

- ✓ Dezinfecția preoperatorie și postoperatorie;
- ✓ Dezinfectarea pielii și a membranelor mucoase înainte de proceduri (injecții, puncții, biopsii);
- ✓ Asepsia rănilor, inclusiv a rănilor provocate de arsuri;
- ✓ Tratamentul adjuvant pentru infecțiile cutanate.

Produsele specifice menționate sunt:

- ✓ Săpun chirurgical Betadine, soluție cutanată 75mg/ml
- ✓ Betadine soluție cutanată 100mg/ml
- ✓ Betadină unguent 100mg

Rămân o alegere populară în multe aplicații medicale și de igienă datorită acțiunii lor rapide și a activității antimicrobiene cu spectru larg de acțiune. Acest lucru înseamnă că pot distruge rapid și eficient o gamă largă de microorganisme, inclusiv bacterii, virusuri și ciuperci.

Peroxigenii

Peroxidul de hidrogen, sau (H_2O_2), este un biocid eficient utilizat pentru dezinfectarea și sterilizarea diferitelor suprafețe, fiind recunoscut pentru activitatea sa împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative.

Poate fi utilizat sub diferite forme, inclusiv:

- Soluție concentrată: Soluție de 3%.
- Soluție diluată: diluată de 5-10 ori cu apă distilată, rezultând o soluție de 30%, eficiente împotriva unei game largi de microorganisme:

- ✓ bacterii,
- ✓ viruși,
- ✓ ciuperci,
- ✓ protozoare.

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este utilizat în mod obișnuit ca dezinfectant în diverse industrii, inclusiv:

- ✓ Produse farmaceutice,
- ✓ Asistență medicală.

Poate ajuta unitățile sanitare să ofere un mediu mai sănătos pentru îngrijire, reducând la minimum riscul de infecții.

Acidul peracetic (CH_3COOOH) (PAA) este recunoscut pentru eficacitatea sa ca biocid, fiind utilizat cu succes în sterilizarea dispozitivelor medicale și a altor suprafețe datorită proprietăților antiseptice puternice împotriva unei game largi de microorganisme, inclusiv bacterii, viruși și ciuperci.

De asemenea, este apreciată capacitatea sa de a fi eficient la concentrații mai mici în comparație cu peroxidul de hidrogen (H₂O₂), fapt ce îl recomandă ca opțiune preferată în anumite aplicații.

Se utilizează pentru decontaminarea instrumentelor medicale, inclusiv a instrumentelor chirurgicale, care sunt sensibile la căldură și care nu pot fi sterilizate prin metode tradiționale.

Utilizarea acidului vaporizat de peroxid de hidrogen (CH₃COOOH) necesită un echipament adecvat pentru a asigura eficacitatea și siguranța acestuia.

Este important de folosit această substanță cu prudență și de respectat instrucțiunile de utilizare și măsurile de siguranță ale producătorului.

Compușii de amoniu cuaternar sunt o clasă de ioni încărcăți pozitiv care sunt utilizați în mod obișnuit ca dezinfectanți pentru piele, agenți tensioactivi și agenți de înmuiere a țesăturilor datorită proprietăților lor antimicrobiene și capacității de a perturba membranele celulare.

Exemple de compuși de amoniu cuaternar sunt:

- ✓ Clorură de benzalconiu;
- ✓ Clorură de metilbenzetoniu;
- ✓ Clorură de cetalconiu;
- ✓ Clorură de cetilpiridiniu;
- ✓ Cetrimidă;
- ✓ Clorură de dofaniu;
- ✓ Bromură de demifen.

În timpul procesului de dezinfecție este esențial să se respecte normele de protecție a muncii pentru a evita eventuale accidente și intoxicații conform legislației în vigoare.

În laboratorul de microbiologie, se utilizeze **tehnicele adecvate de dezinfectare** cum ar fi:

- **dezinfecția prin căldură uscată** sau flambare pentru ansele de nichel-crom sau gâtul flacoanelor de sticlă. Aceste metode sunt esențiale pentru prevenirea contaminării și menținerea unui mediu de lucru sigur și steril în laborator.
- **dezinfecția prin căldură umedă** este o metodă eficientă utilizată în special în procesele automate de spălare a lenjeriei și a veselei, fiind necesară o temperatură de peste 90°C pentru a asigura un nivel adecvat de igienizare. Această metodă contribuie la eliminarea bacteriilor și a altor agenți patogeni, fiind esențială în industria alimentară și sanitară pentru prevenirea răspândirii infecțiilor.
- **dezinfecția cu raze ultraviolete** este eficientă în spațiile închise, mai ales în zonele sensibile cum ar fi laboratoarele sau sălile de operații, atunci când este folosită ca metodă complementară pentru curățarea și dezinfecția chimică a suprafețelor netede și a aerului. Acest tip de dezinfecție poate contribui la reducerea riscului de contaminare cu agenți patogeni și la menținerea unui mediu cât mai curat și sigur pentru personalul medical și pacienți.

Este important să se respecte toate specificațiile și indicațiile referitoare la folosirea aparatelor de dezinfecție cu raze ultraviolete pentru a asigura o acțiune eficientă și sigură. Documentația tehnică detaliată și evidența orelor de funcționare a lămpilor ultraviolete sunt esențiale pentru întreținerea corespunzătoare a acestor echipamente.

Criteriile de alegere corectă a dezinfectantelor sunt următoarele:

Selecția dezinfectantelor trebuie să fie riguroasă pentru a asigura că acestea îndeplinesc criteriile esențiale precum:

- ✓ spectrul de activitate,
- ✓ timpul de acțiune,
- ✓ eficiența în diverse condiții,
- ✓ compatibilitatea cu materialele,
- ✓ gradul de periculozitate.

De asemenea, este important ca acestea să fie stabile în timp, să fie ușor de utilizat și să fie biodegradabile conform standardelor de mediu pentru a proteja mediul înconjurător. Este crucial ca dezinfectantul ales să ofere un mediu sigur și curat în zonele tratate.

Suprafețele, instrumentarul și echipamentele pot fi clasificate în trei categorii: obiecte non-critice, semi-critice și critice.

- Obiectele non-critice sunt cele care nu intră în contact direct cu pacienții și sunt dezinfectate cu soluții dezinfectante.

- Obiectele semicritice sunt cele care intră în contact cu pacienții, dar nu sunt în contact direct cu țesuturile sau circulația sangvină. Acestea necesită sterilizare sau dezinfectare de nivel înalt.

- Obiectele critice sunt cele care intră în contact direct cu țesuturile sau circulația sangvină și trebuie sterilizate folosind metode care distrug toate microorganismele.

Este extrem de important să se ia în considerare categoria din care fac parte suprafețele, instrumentarul și echipamentele atunci când se decide asupra metodei de dezinfecție și/ sau sterilizare pentru prevenirea infecțiilor și asigurarea siguranței pacienților. Dezinfectarea adecvată a **dispozitivelor medicale critice** este esențială în prevenirea infecțiilor și protejarea pacienților

în timpul procedurilor medicale. Respectarea standardelor stricte de sterilizare este crucială în reducerea riscului de transmitere a infecțiilor și menținerea unui mediu medical sigur și curat. Este imperativ ca personalul medical să fie bine informat și să respecte protocoalele de dezinfectare pentru a asigura siguranța și utilizabilitatea dispozitivelor medicale.

Dispozitive medicale semi-critice sunt cele care intră în contact cu membranele mucoase intacte, dar nu penetrează bariera, cu excepția unor cazuri specifice, cum ar fi pielea cu soluții de continuitate.

Printre exemple se numără diverse instrumente medicale, cum ar fi endoscoapele, laringoscoapele și termometrele, precum și anumite suprafețe din unitățile sanitare care pot fi contaminate cu fluide corporale. Aceste articole ar trebui să fie supuse cel puțin unei dezinfecții de nivel mediu pentru a se asigura că există măsuri adecvate de control al infecțiilor.

Dispozitivele non-critice - este crucial să se acorde atenție curățării și dezinfectării dispozitivelor non-critice în vederea prevenirii răspândirii infecțiilor nosocomiale. Utilizarea unei soluții dezinfectante adecvate este crucială pentru a menține igiena și siguranța în mediul medical.

Decontaminarea instrumentelor, suprafețelor și echipamentelor medicale este esențială pentru a preveni răspândirea infecțiilor și a proteja pacienții și personalul medical.

Prin utilizarea dezinfectanților adecvați, unitățile sanitare pot reduce riscul de infecții nosocomiale, protejând viețile și sănătatea pacienților. De asemenea, practicile de igienă și siguranță corecte pot ajuta la prevenirea transmiterii bolilor și a reducerii riscului de infectare. În concluzie, utilizarea unei soluții dezinfectante adecvate este esențială pentru a menține un mediu sănătos și sigur în mediul medical.

Concluzii

Antiseptice și dezinfectante sunt două categorii de produse importante pentru a preveni răspândirea bolilor și microbiologie.

Antiseptice

- ✓ Inhibă creșterea și reproducerea microorganismelor;
- ✓ Utilizate pentru a preveni infectarea pielii și rănilor;
- ✓ Mai puțin eficiente împotriva bacteriilor gram-negative și a virusurilor.

Dezinfectante

- ✓ Elimină complet microorganismele de pe suprafețe sau obiecte;
- ✓ Utilizate pentru a preveni răspândirea bolilor și microbiologie;
- ✓ Mai eficiente împotriva bacteriilor gram-negative și a virusurilor.

Importanța corectei alegeri

Este important să selectăm un antiseptic sau un dezinfectant adecvat, ținând cont de scopul și obiectivul vizat. De asemenea, utilizarea acestora trebuie să respecte întotdeauna instrucțiunile specifice și recomandările oferite de producător.

IV. ETAPELE DIAGNOSTICULUI BACTERIOLOGIC

Infecțiile sunt produse de numeroase microorganisme (bacterii, viruși, ciuperci și paraziți).

Sursa agentului patogen:

- exogen = dobândit din mediu / animale / alte persoane
- endogen = provenit din flora normală

Majoritatea agenților patogeni sunt asociate cu un spectru larg de manifestări clinice și nespecifice, la om. Un anumit microorganism poate produce același tip de sindrom clinic precum mulți alți agenți patogeni. În aceste cazuri este esențială izolarea și identificarea agentului etiologic specific. Diagnosticul de laborator este necesar pentru identificarea unui microorganism specific și oferă informații în ceea ce privește activitatea antimicrobiană *in vitro* a diferitelor substanțe medicamentoase împotriva microorganismului identificat în prealabil (antibiograma).

Anumite boli infecțioase produc simptome specifice și pot fi identificate doar din punct de vedere clinic.

1. Recoltare

Recoltarea este o procedură esențială în diagnosticul bacteriologic.

Produsele patologice sunt produse biologice cu încărcătură microbiană. Acestea sunt selectate funcție de simptomele pacientului. Tipul probei bacteriene trebuie să fie reprezentativ pentru diagnostic, se recoltează din zone diferite, funcție de localizarea infecției:

- sputa,
- mucus nazal și faringian (exsudat) – în angine, inclusiv la purtătorii sănătoși,

- secreții cervicale / uretrale – în infecții cu transmitere sexuală,
- materii fecale – în toxiinfecții alimentare,
- puroi – în infecții cutanate,
- sânge – în septicemii (hemocultura),
- urină – în infecții urinare (urocultura),
- lichid cefalo-rahidian (LCR), pleural și articular – în infecții ale seroaselor însoțite de puroi,
- țesut tisular (biopsie).

Sputa, mucusul din sfera ORL / genitală și scaunul conțin în mod normal numeroase tipuri de bacterii saprofite. Prin urmare este necesară diferențierea microorganismului patogen de cele saprofite.

Sângele, urina sau LCR sunt sterile și în cazul unei infecții conțin exclusiv germii patogeni.

Momentul optim al recoltării este înaintea instaurării tratamentului antimicrobian.

Cantitatea probei patologice și timpul în care probele ajung în laborator influențează calitatea rezultatelor testelor de laborator

- probele biologice trebuie să fie colectate în cantitate suficient de mare pentru a obține o examinare microbiologică eficientă;
- cu cât timpul dintre recoltare și izolarea microorganismului este mai scurt, cu atât și riscul degradării produselor patologice este mai scăzut.

2. Examen macroscopic și microscopic

Examenul macroscopic - descrie aspectul secrețiilor: purulent, cremos, opac, gălbui etc.

Examenul microscopic – probele biologice (frotiurile) care conțin încărcătură bacteriană se colorează cu coloranți speciali (Gram sau cu albastru de metilen). Aceștia colorează microorganismele și astfel se pot observa și detectate ușor la microscop: formă, dimensiune, culoare.

Bacteriile sunt clasificate conform colorației gram în:

- gram-pozitive: frotiul se colorează în albastru (colorantul este absorbit);
- gram-negative: frotiul se colorează în roșu (colorantul nu este absorbit).

Multe microorganisme au însă același aspect și nu pot fi diferențiate cu ajutorul unui microscop. Spre exemplu virusurile din cauza dimensiunii foarte mici, nu pot fi identificate prin examen microscopic.

3. Izolarea bacteriilor din produsele patologice

Atunci când probele conțin un număr scăzut de microorganisme este îngreunată examinarea microscopică. Prin urmare se va recurge la cultivarea acestora în laborator, folosind medii de cultură. În majoritatea cazurilor, este necesară izolarea și cultivarea microorganismului în medii de cultură artificiale.

Microorganismele sunt cultivate fie pe medii de cultură solide (cel mai frecvent), fie pe medii de cultură lichide.

Majoritatea microorganismelor cresc pe mediile de cultură neselective. Izolarea agenților infecțioși necesită însă utilizarea mediilor selective.

Mediile selective conțin:

- substanțe nutritive specifice - atunci când se suspectează infecția cu un anumit germen;
- carbohidrați în asociere cu un indicator de pH, deoarece unele microorganisme au capacitatea de a fermenta carbohidrații: mediile MacConkey, Levine, eozin albastru de metilen;
⇒ identificarea enterobacteriilor
- substanțe inhibitoare, care inhibă dezvoltarea anumitor tipuri de microorganisme și permit, în același timp, izolarea microorganismelor specifice, care sunt rezistente la aceste substanțe: Thayer-Martin;
⇒ identificarea cociilor gram negativi (genul *Neisseriae*)

4. Identificarea bacteriilor din produsele patologice

După însămânțarea probei pe un mediu de cultură sunt evaluate următoarele aspecte:

- Caracterile culturale (morfologia celulară):
 - morfologia celulară și a coloniilor permite identificarea preliminară a tipului de microorganism, pentru unele specii
 - ✓ coci sau bacili gram pozitivi / negative,
 - ✓ sporulați / nesporulați,
 - ✓ mobili / imobili,
 - ✓ culoare,
 - ✓ formă,
 - ✓ aspect,
 - ✓ diametrul coloniilor,
 - ✓ miros specific.

- Reacțiile biochimice:
 - sunt evaluate proprietățile biochimice ale diverselor micro-organisme pe baza unor reacții specifice
 - ✓ reacția la catalază / coagulază,
 - ✓ reacția de fermentare a zaharurilor (glucoză / lactoză / fructoză, manitol), a inulinei,
 - ✓ caracterul oxido-reducător,
 - ✓ reacția de producere a compușilor: H₂S, indol, fosfataza,
 - ✓ reacția la bacitracină, optochin, novobiocin, furazolidon, bilă esculin,
 - ✓ *procesul de lichefiere a gelatinei,*
 - ✓ *hidroliză a hipuratului etc.*
- Teste de laborator, care studiază și identifică:
 - materialul genetic al microorganismului (ADN sau ARN);
 - ✓ tehnica PCR - sunt produse mai multe copii ale unei gene , ceea ce ușurează identificarea unui microorganism,
 - ✓ testele genetice se efectuează când se suspectează o anumită infecție,
 - antigenele microorganismului;
 - ✓ fiecare microorganism are antigene specific,
 - ✓ sunt detectate direct și rapid microorganismele,
 - ✓ infecția, prin dozarea antigenelor, este diagnosticată rapid,
 - anticorpii;
 - ✓ sistemul imunitar al organismului uman produce anticorpi ca răspuns la prezența microorganismului, în câteva zile / săptămâni,
 - ✓ titrul de anticorpi dozat imediat după debutul bolii este adesea negativ,

- ✓ titrul de anticorpi crescut după zile / săptămâni de la debutul boli indică, în general, o infecție recentă, activă,
- ✓ infecția, prin dozarea anticorpilor, este diagnosticată mai târziu.

5. Medii de cultură

Dezvoltarea în domeniul microbiologiei datează din secolul al 19-lea, atunci când au apărut primele medii de cultură bacteriene.

Cultura bacteriană a fost prima tehnică care a studiat microbiomul uman.

Mediile de cultură sunt medii artificiale, mai rar naturale, utilizate în microbiologia clinică, care imită mediul de creștere și dezvoltare al microorganismelor. Există numeroase medii de cultură, de la cele simple la cele selective și diferențiale, îmbogățite cu diverse substanțe, necesare cultivării și dezvoltării *in vitro* a bacteriilor.

Pentru fiecare gen sau specie bacteriană se folosește un mediu de cultură specific.

Mediile de cultură au următoarele proprietăți:

- sunt sterile,
- sunt repartizate, de regulă, în plăci Petri sau eprubete / tuburi,
- conțin amestecuri de diverse substanțe care favorizează creșterea și dezvoltarea microorganismelor,
 - substanțe nutritive: apă, carbon (carbohidrați, spre exemplu glucoză, lactoză etc), azot (spre exemplu, sulfat de amoniu), substanțe minerale și nutritive, surse de energie, factori de creștere (aminoacizi, vitamine, antioxidanți, baze purinice și pirimidinice, compuși pe bază de sânge) etc.
- ph-ul optim pentru creșterea microorganismului de interes: de regulă un ph neutru,

- condiții de aerobioză / anaerobioză funcție de tipul microorganismului,
- scopul:
 - cultivarea (creșterea) unui anumit microorganism în probele patologice ale pacienților, cu obținerea unei culturi microbiene pure,
 - izolarea microorganismului,
 - identificarea și caracterizarea microorganismului.

5.1. Clasificarea mediilor de cultură

Mediile de cultură se clasifică funcție de mai mulți parametri:

- Consistența mediului de cultură
 - lichide: bulion, apa peptonată
 - ✓ nu conțin agar / geloză,
 - ✓ conțin peptone și aminoacizi,
 - ✓ utilizare restrânsă,
 - ✓ descoperit pentru prima dată, în anul 1860, de către cercetătorul Louis Pasteur,
 - semisolide: geloză semisolidă
 - ✓ conțin agar / geloză în concentrație mică 0.5%, adăugat la mediul lichid,
 - solide: geloză sânge, geloză nutritivă,
 - ✓ conțin agar / geloză în concentrație mai mare 1-2%, adăugat la mediul lichid,
 - ✓ reprezintă majoritatea mediilor de cultură,
 - ✓ descoperit pentru prima dată de către cercetătorul Robert Koch.

Substanța agar / geloză are următoarele proprietăți:

- agent de solidificare a mediului de cultură,
 - o polizaharidă obținută din algele marine,
 - caracter inert,
 - solubilă în apă,
 - se topește la 98°C,
 - se solidifică la 42°C și formează un gel cu aspect transparent.
- Tipul de substanțe nutritive
 - Medii de cultură naturale,
 - ✓ conțin lapte, ouă, ser de bou coagulat;
 - Medii de cultură artificiale,
 - ✓ conțin substanțe chimice.
 - Compoziția, complexitatea mediului de cultură și scopul utilizării (funcție de tipul microorganismului cultivat)

5.1.1. Medii de cultură simple

- ✓ cresc majoritatea speciilor microbiene,
- ✓ bulion simplu, apă peptonată, geloză simplă.

5.1.2. Medii de cultură complexe

- ✓ se adaugă diverse substanțe la mediile simple, de exemplu: sânge, ser, zaharuri;
- ✓ cresc specii microbiene mai pretențioase;
- ✓ geloză sânge / ser, agar chocolate, geloză lactozată, bulion sânge / ser etc.

5.1.3. Medii de cultură speciale

5.1.3.1. Medii de cultură selective

- ✓ se folosesc pentru cultivarea și identificarea unui germene din probe plurimicrobiene,

- ✓ favorizează dezvoltarea microorganismului de interes,
- ✓ inhibă dezvoltarea altor microorgnisme din proba respective,
- ✓ se adaugă diverse substanțe cu caracter inhibitor pentru toate celelalte tipuri de microorganisme, de exemplu: antibiotice, clorură de sodiu, săruri biliari, coloranți),
- ✓ mediul Chapman, MacConkey, Thayer Martin, Sabouraud, mediul cu telurit de potasiu,
- ✓ mediul Muller Hinton - folosit pentru antibiograme.

În tabelul de mai jos sunt redată câteva exemple de microorganisme și mediul de cultură specific.

Tabelul 1. Microorganism versus mediul de cultură

Microorganism	Mediul de cultură
Bacterii gram negative	MacConkey
Sp. <i>Neisseriae</i> (<i>N. gonorrhoeae</i> și <i>N. meningitidis</i> .)	Thayer– Martin agar
Sp. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lowenstein Jensen
Sp. <i>Vibrio</i>	Thiosulphate Citrate Bilesalt Sucrose (TCBS) agar
Sp. <i>Salmonella</i> și <i>Shigella</i>	DCA (Deoxycholate Citrate Agar) XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar
Sp. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Potassium tellurite agar (PTA)
Sp. <i>Staphylococcus</i>	Chapman solid
Sp. <i>E coli</i>	Levine
Levuri (<i>Candida</i>)	Sabouraud

5.1.3.2. Medii de cultură diferențiale

- ✓ substrat pentru realizarea reacțiilor biochimice,
- ✓ conțin substanțe biochimice (citrat, uree), zaharuri (glucoză, lactoză, maltoză), indicatori de culoare/ph,
- ✓ descrie o proprietate biochimică a unui microorganism,
- ✓ diferențiază speciile bacteriene pe baza proprietăților metabolice,
- ✓ virajul culorii/ph indică prezența unei anumite specii,
- ✓ exemple: MacConkey agar, geloză lactozată, Chapman, Levine, Leifson.

5.1.3.3. Medii de cultură selective și diferențiale

- ✓ au ambele proprietăți
 - favorizează cultivarea strict a microorganismului de interes în defavoarea altor microorganism,
 - diferențiază diferite specii microbiene funcție de caracterele biochimice,
- ✓ exemple: Chapman, Levine

5.1.3.4. Medii de cultură destinate transportului

- ✓ asigură viabilitatea microorganismelor,
- ✓ mediul Stuart, Amies, Cary Blaire , mediul cu / fără cărbune.

În tabelul de mai jos sunt redate câteva exemple de microorganisme și mediul de cultură specific.

Tabelul 2. Microorganism versus mediul de cultură

Microorganism	Mediul de cultură
<i>Sp. Neisseria</i>	Amies, Stuart
<i>Streptococ</i>	Pike
<i>Salmonella, Shigella</i>	Buffered glycerol saline Cary Blair-mediul de transport
<i>Vibrio cholerae</i>	Venkatraman-Ramakrishnan Cary Blair-mediul de transport

Mediile de cultură complexe, selective, îmbogățite și cele destinate testelor biochimice deservește la stabilirea diagnosticului de laborator.

Numărare a unităților formatoare de colonii (Enumerarea bacteriană)

Este o metodă importantă în domeniul microbiologiei deoarece reflectă și estimează conținutul microbian – numărul de microorganisme într-o probă. În microbiologie, numărarea bacteriilor s-a efectuat mult timp manual și a reprezentat metoda standard.

Un anumit număr de celule, care sunt prezente în proba patologică, sunt inoculate într-un mediu de cultură nutritiv și după o perioadă de timp (de cele mai multe ori peste noapte) formează o întreagă colonie.

Unitățile formatoare de colonii (UFC) reprezintă numărul de bacterii viabile care sunt identificate pe un mediu de creștere specificat.

Dezavantajele măsurătorilor manuale:

- timpul necesar alocat procesului de măsurare este mare (decurge lent),
- reproductibilitate scăzută,
- obositor,
- nepotrivit pentru testele de randament ridicat.

În vederea optimizării cercetărilor au fost dezvoltate sistemele automatizate. Recent au apărut camerele digitale moderne și numeroase software-uri care au facilitat procesul de numărare a bacteriilor și au oferit o imagine automatizată a coloniilor bacteriene. Cu toate acestea, erorile nu sunt excluse.

Avantajele analizelor moderne:

- viteză mare, timp scurt,
- mai puțin subiectivă,

- precizie și acuratețe crescute,
- reproductibilitate crescută.

Numărarea microscopică directă

Numărarea microscopică directă este o metodă ușoară, rapidă și simplă de numărare a microorganismelor într-o probă. Tehnica permite vizualizarea morfologiei bacteriilor și este utilizată, de asemenea, și în alte tipuri de cercetări. Nu necesită echipament complex.

Procesul de numărarea al celulelor microbiene parcurge următoarele etape:

- se pregătesc probele = suspensii de celule microbiene; dacă suspensiile sunt foarte dense, acestea se vor dilua în mod corespunzător;
- probele se pregătesc pe o lamelă de sticlă ;
- se obține un frotiu;
- se colorează frotiul;
- se numără celulele microbiene cu ajutorul microscopului;
- se folosește un diapozitiv specializat de sticlă = o cameră de numărat Petroff-Hausser; acesta conține o cameră de 0.02 mm în centrul dispozitivului;
- se numără un volum exact dintr-o suspensie de celule microbiene;
- se determină numărul total de celule folosind calcule matematice;
- numărul de celule / mm = numărul de celule numărate x factorul de diluție x 50.000.

(50.000 = factorul utilizat pentru a calcula numărul de celule pentru 1 ml suspensie).

Noțiuni cu privire la conflictul micro- și macroorganism

În anul 1673 cercetătorul olandez Anton van Leeuwenhoek a observat, pentru prima dată, celula bacteriană, cu ajutorul microscopului pe care acesta l-a dezvoltat. A obținut o imagine de 50-300x mai mare.

Inițial a denumit aceste structuri mici „animalcules”, confundându-le cu animale mici. A mai descris microorganisme precum drojdii, ciuperci cu aspect filiform, protozoare și paraziți (*Giardia lamblia*).

Cercetările din domeniul microbiologiei au stagnat apoi, timp de aproximativ 200 de ani.

A urmat apoi o etapă important, dezvoltarea noilor metode de izolare a tulpinilor microbiene în stare pură și descoperirea mediilor de cultură.

Microorganismele au un caracter dual și sunt considerate atât „dușmani”, precum și „prieteni” al omului.

La nivel mondial, omul suferă o evoluție permanentă, de la naștere la moarte. Un rol aparte în această evoluție o au microorganismele, care de-a lungul istoriei au contribuit la numeroase pandemii cu final tragic, având un grad de mortalitate extrem de ridicat.

Pe de altă parte microorganismele au un rol foarte important și benefic pentru organismul uman, fără de care omul nu poate supraviețui și nici nu poate evolua.

Rolul microorganismelor în mediul înconjurător și în organismul uman:

- constituie microbiota intestinală, care ajută la procesul de digestive,
- rol în conservarea alimentelor,
- rol în dezvoltarea antibioticelor,
- rol în dezvoltarea tehnologiilor ADN recombinat.

V. METODE DE DIAGNOSTIC IMUNOLOGICE-SEROLOGICE UTILIZATE ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

1. Noțiuni introductive

Diagnosticul de laborator al diferiților agenți microbieni se bazează pe utilizarea a două mijloace de diagnostic:

- *diagnostic bacteriologic*, prin care identificăm agentul etiologic bacterian și furnizăm date cu privire la stabilirea sensibilității;
- *diagnostic imunologic / imuno-serologic*, prin care identificăm anticorpi specifici în serul diferitelor fluide biologice, pentru o mai bună identificare și stabilire al agentului microbial.

Putem afirma că diagnosticul imunologic sau imuno-serologic reprezintă o etapă obligatorie în diagnosticul diferitelor infecții provocate de agenții microbieni (bacterii, virusuri, paraziți, fungi etc.), fiind de fapt un **mijloc complex de diagnostic** ce are la bază specificitatea dintre **antigen** și **anticorp**.

ANTIGENELE MICROBIENE – molecule pe care organismul le percepe ca *non-self* (străine organismului), ce produc un răspuns imunitar, fiind capabile să reacționeze cu diferiți receptori specifici ai organismului (numiți **ANTICORPI**).

ANTICORPII / IMUNOGLOBULINELE – proteine serice care migrează în câmpul electric, prezenți și în alte umori sau secreții, cu o structură capabilă să le asigure legarea fermă și specifică de antigen.

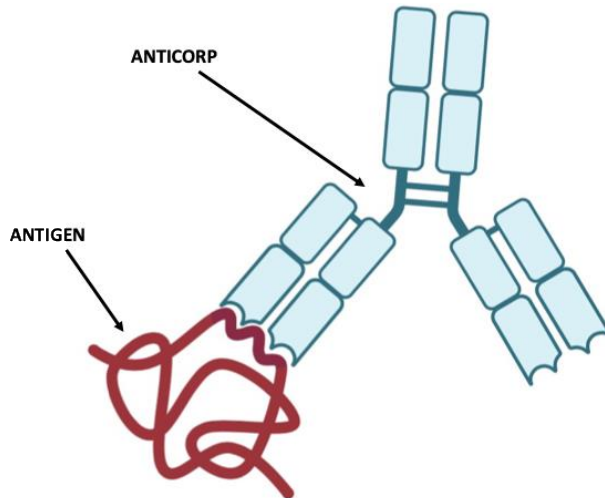


Figura 1. Interacțiune ANTIGEN-ANTICORP.

ANTICORPII sau **IMUNOGLOBULINELE** la rândul său, în organismul uman, în funcție de interacțiunea cu diferitele antigene microbiene, se împart în:

- ***Imunoglobulina G (IgG)*** – reprezintă 70%-80% din Ig serice, concentrația normală fiind atinsă la vârsta de 5-8 ani. Este o Ig serică ce trece prin placentă;
- ***Imunoglobulina A (IgA)*** – reprezintă 17%-20% din Ig serice, concentrația normală fiind atinsă la vârsta de 10-11 ani (explicație: frecvența infecțiilor respiratorii la copii);
- ***Imunoglobulina M (IgM)*** – reprezintă 5%-8% din Ig serice, apare în răspunsul imun primar și prezența acesteia indică o infecție acută, recentă;
- ***Imunoglobulina E (IgE)*** - reprezintă Ig serică ce se găsește în concentrații crescute la persoane alergice, fiind responsabilă de manifestările alergice de tipul I anafilactic (fenomene de ***hipersensibilitate de tip I***);
- ***Imunoglobulina D (IgD)*** – Ig serică ce se găsește în ser doar în urme.

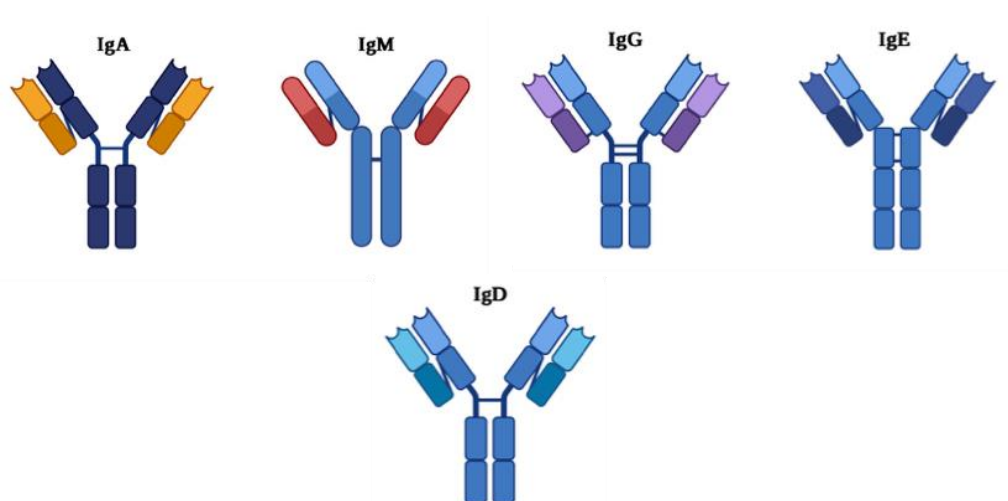


Figura 2. Tipuri de imunoglobuline serice (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD).

Astfel, pe baza acestor noțiuni introductive, se pot deosebi diferitele teste imunologice și serologice utilizate în laboratorul de microbiologie. Deoarece testele imunologice utilizate în laboratorul de microbiologie sunt realizate prin producerea de anticorpi artificiali care se potrivesc exact cu molecula sau microorganismul în cauză. Când acești anticorpi vin în contact cu diferite fluide biologice (exemple: probă de sânge, urină sau materii fecale), ce prezintă în compoziție molecula sau microorganismul (antigene), se leagă de aceasta, având loc astfel identificarea microorganismului ca fiind prezent.

În continuare, se vor prezenta tipurile de teste imunologice și serologice ce se realizează în laboratorul de microbiologie.

2. Reacții imunologice și serologice utilizate în diagnosticul de laborator al infecțiilor

A) METODE TRADITIONALE DE DIAGNOSTIC

2.1. Reacția de aglutinare

Fenomenul de aglutinare apare atunci când un antigen și anticorpul său se combină în prezența electroliților, la o temperatură și un pH specific, ducând la formarea unei aglutinări vizibile a particulelor (aparitia unor particule fine de agregat).

Apare atunci când **antigenele și anticorpii reacționează în proporții echivalente**, fiind o reacție analogă cu reacția de precipitare, prin faptul că anticorpii acționează ca o punte pentru a forma **o rețea tridimensională** între acestia și celulele care transportă antigenul pe suprafața lor. Deoarece aceste rețele sunt mult mai mari decât un antigen solubil, rezultatul este mai vizibil cu ochiul liber atunci când acestea se agregă.

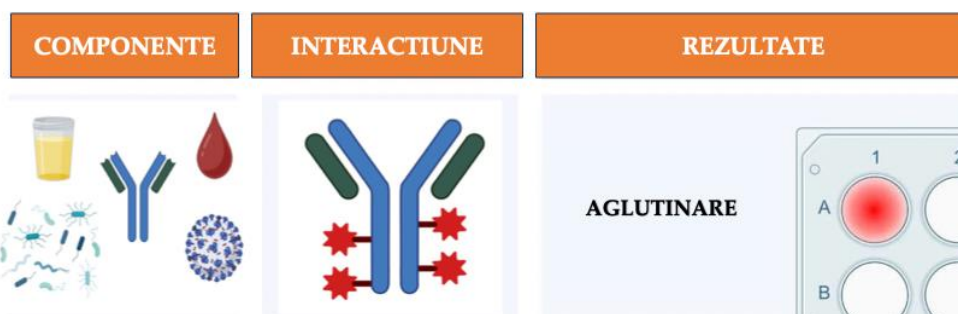


Figura 3. Reprezentare reacție de aglutinare.

Reacțiile de aglutinare pot fi împărțite în **trei grupe**:

2.1.1. Activ/aglutinare directă

În aglutinarea activă, se produce aglutinarea directă a antigenului de particule (antigene) cu anticorpi specifici. Aglutinarea directă utilizează agenți patogeni ca sursă de antigen, astfel se măsoară nivelul de anticorpi produs de

o gazdă infectată cu acel agent patogen. Legarea anticorpilor de antigenii de suprafață al microorganismelor (bacterii, virusuri) poate fi de următoarele tipuri:

- ***Aglutinare culisantă sau pe lamă*** – suspensia antigenului necunoscut este menținută pe lamă și se adaugă o picătură de antiser standardizat, astfel având loc reacția. Rezultatul pozitiv este indicat prin formarea de aglomerări vizibile.
- ***Aglutinare în tuburi*** – se efectuează în diferite tuburi / eprubete, prin care serul este diluat prin metoda diluțiilor succesive și se adaugă diferite suspensii standardizate de antigen (specifice pentru boala sau infecția suspectată). După incubare, este indicată reacția antigen-anticorp prin aglutinări vizibile.
- ***Testul Coombs*** – este utilizat pentru detectarea anticorpilor anti-Rh și a anticorpilor incompleți specifici în bruceloză sau alte boli.

2.1.2. Aglutinare pasivă

În aglutinarea pasivă se utilizează particule purtătoare, acoperite cu antigene solubile. În acest fel, fie anticorpul, fie antigenul sunt atașate de un anumit purtător inert, astfel particulele se aglutinează atunci când antigenul sau anticorpul corespunzător interacționează. Exemple de particulele purtătoare, acoperite cu antigene solubile: particule de latex, particulele de carbon, bantonita etc.

2.1.3. Hemaglutinare

În hemaglutinare, sunt utilizate ca și particule purtătoare globulele roșii sau eritrocitele. Atunci când sunt utilizate eritrocitele acoperite cu antigen pentru a detecta anticorpii în ser, testul se numește ***testul de hemaglutinare indirectă*** (IHA). Hemaglutinarea utilizează eritrocitele ca și purtători biologici pentru antigenele bacteriene, diferite polizaharide sau proteine purificate.

Atunci când anticorpul este atașat direct de eritrocite pentru a detecta antigenul microbial, testul este cunoscut sub numele de *hemaglutinare pasivă inversă* (RPHA).

2.2. Reacția de precipitare

2.2.1. Imunodifuzia simplă radială (tehnica Mancini)

Imunodifuzie radială sau metoda Mancini este o tehnică unică de difuzie prin care o soluție care conține antigenul este plasată în diferite godeuri, într-un gel sau pe o suprafață de agar impregnată uniform cu anticorpi. Diametrul inelului care se precipită în jurul godeului indică o interacțiune specifică antigen-anticorp și corespunde cantității de antigen din soluție. Ca dezavantaje, tehnica Mancini prezintă: timpul de reacție foarte lung (18–48 de ore), prezența cationilor metalici poate interfera, obținându-se rezultate fals pozitive etc.

Se utilizează pentru depistarea și cuantificarea diferitelor imunoglobuline, dozarea hormonilor, enzimelor, estimarea transferinei serice și alfa-fetoproteinei, determinarea purității unui preparat de antigen etc.

2.2.2. Imunodifuzia dublă (tehnicile Ouchterlony și Elek)

Imunodifuzia dublă este o reacție specială de precipitare pe diferite geluri (exemplu agar) în care anticorpul reacționează cu antigeni specifici, formând complexe de tipul antigen-anticorp care pot fi observate ca o linie de precipitat. Mai exact, în imunodifuzia dublă, atât anticorpul, cât și antigenul sunt lăsate să difuzeze în gel, migrând unul față de celălalt, formând astfel un precipitat la locul echivalenței.

Se utilizează în detectarea, identificarea și cuantificarea anticorpilor și antigenelor, cuantificarea anticorpilor în sero-diagnosticul variolei, identificarea antigenelor din diferite specii de fungi, demonstrarea profilului toxicologic al speciei *Corynebacterium diphtheriae*.

B) METODE IMUNOLOGICE MODERNE DE DIAGNOSTIC

2.3. Tehnica ELISA

Reacțiile ce pot avea loc în medii lichide sau solide, în special în cazul sistemelor de fază solidă pentru separarea moleculelor libere și a celor marcate, utilizează tehnica ELISA (Enzyme – Linked – Immuno – Sorbent – Assay). Aceasta se bazează pe reacții complexe de tip antigen–anticorp legate (conjugate) cu reacții enzimă–substrat, efectuate pe un suport solid (exemplu: nitroceluloză), în diferite plăci sau kituri de testare ELISA, la care se adaugă proba biologică și apoi un cromofor reprezentat de anticorpul anti-Ac testat sau anti-Ag, la care s-a legat un efector enzimatic și substratul care, prin conversie, generează semnale de culoare detectabile prin diferite metode (vizuală, microscopică, spectrofotometrică). Se utilizează două tipuri de substanțe de sinteză: CONJUGATUL (anticorpi conjugați cu o enzimă) și SUBSTRATUL (substratul enzimei din conjugat).

Este utilizată pentru evidențierea anticorpilor (din boli infecțioase, boli autoimune) sau a antigenelor din diferite proteine plasmatică, hormoni, metaboliți medicamentoși etc.

Poate fi de 3 tipuri:

- **ELISA DIRECT** – analitul este un ANTIGEN (viral, bacterian), în care se adaugă serurile de testat pe suportul solid (în godeurile plăcii), se adaugă CONJUGATUL (anticorpi specifici conjugați cu o enzimă – împotriva antigenului țintă), iar la final SUBSTRATUL enzimei conținute în conjugat. Apariția culorii specifice kitului relevă prezența complexului „antigen țintă + anticorp conjugat cu enzima + substrat al enzimei” = test POZITIV.
- **ELISA INDIRECT** – analitul este un ANTICORP (anti-viral, anti-bacterian), iar godeurile plăcii sunt tapetate (acoperite) din fabricație cu un antigen corespunzător anticorpilor de testat. La adăugarea serului de testat, dacă acesta conține anticorpii respectivi, aceștia vor reacționa cu antigenele care tapetează godeul și vor forma complexul antigen–anticorp.
- **ELISA tip „SANDWICH”** – în care cele două tipuri descrise anterior sunt utilizate în același timp.

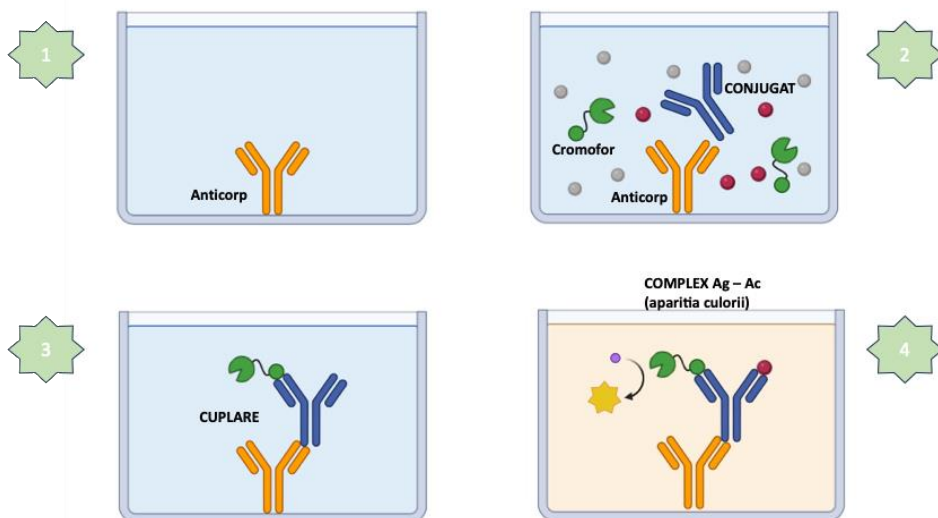


Figura 4. Tehnica ELISA – varianta tip “sandwich”.

2.4. Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction – reacția în lanț a polimerazei)

Tehnica PCR este un exemplu tipic de test de amplificare a acidului nucleic, ce se bazează pe extracția și purificarea moleculei de ADN și amplificarea exponențială a secvenței țintă, folosind o polimerază ADN termostabilă și două primere oligonucleotidice specifice. După ce are loc reacția, produsul amplificat poate fi detectat prin mai multe tehnici, inclusiv tehnicile de tipul electroforezei cu gel, metodelor colorimetrice și secvențierea genică. Este cel mai des utilizată pentru detectarea virusurilor medicale (exemplu: virusul HIV, Herpes simplex, coronavirus etc.).

TEHNICA + Materiale de lucru:

- o moleculă de ADN-matriță ce conține secvența ce se dorește a fi amplificată;

- ADN-polimerază – enzimă capabilă să polimerizeze o nouă catenă de ADN pe baza complementarității cu ADN-ul matriță;
- 2 oligonucleotide amorsă = PRIMERII – complementare cu capetele 3' ale catenelor sens și anti-sens ale ADN-ului matriță;
- 4-dezoxiribonucleozid-trifosfați (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- o soluție tampon în care ADN-polimeraza este activă și stabilă;
- diferiți ioni bivalenți (Mg^{2+} sau Mn^{2+}) și ioni monovalenți (K^+).

Etapele metodei PCR cuprind:

a) **I etapa: procesul de denaturare** – constă în incubarea amestecului de reacție (ADN-ul matriță, polimeraza, oligonucleotidele amorsă și cei 4 dezoxiribonucleozid-trifosfați) la o temperatură de 90–95°C, timp de aproximativ un minut. Prin încălzire, ADN-ul din amestec este denaturat, separându-se în cele două catene componente, iar la final ADN-ul devine monocatenar.

b) **A II-a etapă: procesul de hibridizare** – constă în incubarea amestecului de reacție la o temperatură dictată de temperatura de topire a oligonucleotidelor amorsă. Are loc legarea acestora de ADN-ul monocatenar obținut în etapa anterioară, pe bază de complementaritate la nivel de secvență.

c) **A III-a etapă: sinteza propriu-zisă** – implică incubarea amestecului din etapa anterioară la temperatura de 72°C pentru un interval de timp variabil, moment în care ADN-polimeraza devine activă și adaugă nucleotide la capătul 3'-OH al oligonucleotidelor amorsă legate, extinzându-le. Nucleotidele sunt adăugate în ordinea dictată de complementaritatea cu ADN-ul matriță, având loc astfel replicarea unei noi molecule de ADN dublu-catenar. Una dintre catene este catena originală (matriță), iar cealaltă este catena nou sintetizată, care încorporează oligonucleotida amorsă (primerul).

Cele trei etape alcătuiesc un ciclu ce este repetat, în mod obișnuit, de 35–40 de ori într-o reacție PCR, întregul proces durând aproximativ 3–4 ore.

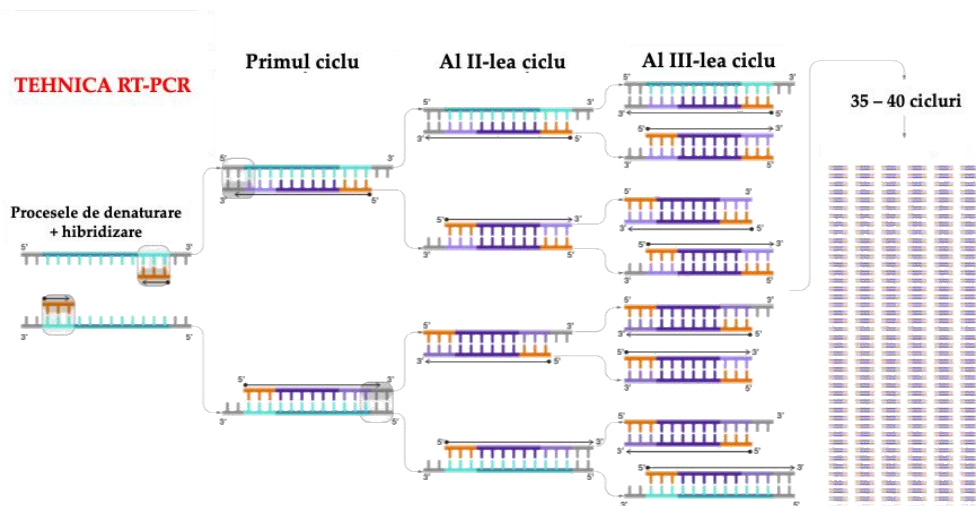


Figura 5. Tehnica PCR.

VI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL COCILOR GRAM POZITIVI ȘI GRAM NEGATIVI

- ❖ Metoda principală de diferențiere dintre bacteriile gram pozitive și bacteriile gram negative: **colorația gram**, metodă utilizată frecvent în microbiologie.

Colorația gram a fost descoperită de către bacteriologul danez Hans Christian Gram în anul 1884. În acest scop este utilizat colorantul violet cristal.

Bacteriile gram pozitive au un strat de peptidoglican mai gros la nivelul peretelui celular, de aprox 20-80 nm și prin urmare au capacitatea de a reține colorantul și produc o colorație albastru-violet, care poate fi observată la microscop.

Bacteriile Gram negative au însă un strat mai subțire de peptidoglican, de doar 2–3 nm, acoperit de o membrană externă bistrat lipidică, conținutul redus de peptidoglican nu permite reținerea colorantului și prin urmare, acestea nu prezintă colorația albastru-violet specifică bacteriilor Gram pozitive, ci se colorează roșu, caracteristic bacteriilor Gram negative.

Clasificare

Cocii gram pozitivi cuprind următoarele genuri:

✚ *Staphylococcus*:

- Stafilococi coagulazo-pozitivi: sp. *Staphylococcus aureus*
- Stafilococi coagulazo-negativi: sp. *Staphylococcus epidermidis*, sp. *Staphylococcus saprophyticus* etc

✚ *Streptococcus*:

- Streptococi α -hemolitici:

- *sp. Streptococcus viridans* - cu numeroase subspecii
S. mitis, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*
- *sp. Streptococcus pneumoniae*
- Streptococi β -hemolitici: *sp. Streptococcus pyogenes*,
Streptococcus agalactiae, *Streptococcus dysgalactiae* și
Streptococcus equi, *Streptococcus bovis*.
- Streptococi γ -hemolitici: enterococii

Medii de cultură utilizate în laboratorul de microbiologie

Există numeroase microorganisme care nu secretă substanțe nutritive, motiv pentru care au nevoie de un mediu de cultură care să conțină aceste substanțe și care favorizează creșterea bacteriană; mediile de cultură nutritive sunt des folosite și în general sunt soluții apoase provenite din extracte vegetale sau de animale și conțin proteine hidrolizate, carbohidrați și vitamine (în special vitamine din grupul B).

Mediile de cultură pot fi atât solide cât și lichide. Mediul solid se prepară prin adăugarea unui extras de carbohidrat, obținut din alge marine – numit agar, peste mediul lichid cu ulterioara gelificare a mediului, la 37°C agarul formează așadar un gel ferm, se folosește agar în concentrație de 1-1.5% g/v pentru a oferi fermitate gelului, astfel enzimele care sunt sintetizate de către diferitele microorganisme nu au capacitatea de a lichefia gelul; din acest motiv, în compoziția mediului, adesea se preferă gelul și mai puțin gelatina, care nu formează un gel ferm la 37°C.

De asemenea există medii de cultură îmbogățite cu anumite substanțe care au rolul de a inhiba creșterea anumitor tipuri de tulpini și totodată favorizează dezvoltarea altor tulpini, având efect selectiv, spre exemplu stafilococii și micrococii se dezvoltă foarte bine pe mediile de tip agar îmbogățite cu manitol.

Mediile solide pe care sunt înșămânțate microorganisme anaerobe au în compoziție substanțe reducătoare (aminoacizi pe bază de sulf, tioglicolat de sodiu), care creează un mediu redox favorabil dezvoltării microorganismelor anaerobe.

Au fost identificate și alte microorganismele care secretă substanțe pornind de la săruri minerale, carbon sau azot și care secretă spre exemplu: vitamine, aminoacizi, nucleotide - substanțe necesare dezvoltării acestora; aceste microorganisme au capacitatea de a crește pe medii chimice.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL COCILOR GRAM POZITIVI

Cocii gram pozitivi sunt bacterii larg răspândite în natură, sunt agenți comensali ai țesutului cutanat și al mucoaselor, fiind localizați la nivel respirator, digestiv sau genital.

1. GENUL *STAPHYLOCOCCUS*

STAFILOCOCI COAGULAZO-POZITIVI ȘI NEGATIVI

Diagnosticul de laborator al stafilococilor

Diagnosticul este strict bacteriologic, în infecții ale pielii și ale țesuturilor moi este suficient un diagnostic clinic, în alte situații când nu este suficient un examen clinic se vor preleva probe biologice din diferite zone funcție de localizarea infecției și înainte ca pacientul să înceapă tratament cu antibiotice.

Diagnosticul infecției invazive cu stafilococi cuprinde mai multe etape, descrise mai jos:

❖ **Recoltare**

Proba bacteriană se rezoltează din lichide care sunt în mod normal sterile, funcție de localizarea infecției:

- exudat nazal și faringian – în cazul anginelor, inclusiv la purtătorii sănătoși;
- puroi – în infecții cutanate;
- materii fecale – în toxiinfecții alimentare;
- urină – în infecții urinare și se va efectua urocultura;
- sânge – în cazul septicemiilor și se va efectua hemocultura;
- lichid cefalo-rahidian, pleural și articular – în infecții ale seroaselor însoțite de puroi.

❖ **Transport**

Probele se vor transporta către laborator, cât mai repede, în maxim 2 ore.

❖ **Identificare**

Identificarea stafilococilor se realizează atât direct cât și prin însămânțarea probei pe un mediu de cultură cu evaluarea caracterelor culturale și a structurii antigenice.

❖ **Evaluare macroscopica si microscopia (examen direct)**

La nivel macroscopic se va observa un lichid purulent de culoare galbenă și cu textură cremoasă.

La nivel microscopic se observă stafilococii dispuși în grup, sub formă de clustere sau ciorchine de struguri, cu formă sferică și cu un diametru mai mic de 1 μm, de asemenea sunt evidențiate și numeroase leucocite, în acest sens se folosesc frotiuri colorate gram.

❖ Izolarea și cultivare:

Probele sunt însămânțate în medii de cultură:

- neselective:
 - geloză simplă sau nutrient agar,
 - geloză sânge ,
 - bulion;
- selective:
 - îmbogățite cu 5-10% NaCl și manitol (mediul Chapman) - pentru materiile fecale,
 - mediul Ludlam;
- medii lichide: flacoane pentru hemocultura (pentru sange), proba este apoi incubata timp de 2 -14 zile la 37°C.

După însămânțare plăcile se incubează la 37C timp de 24 de ore;

❖ Morfologie si caractere culturale:

Sunt coci gram pozitivi, catalazo-pozitivi, de culoare galbenă (mai rar albă) cu formă convexă sau rotundă și aspect neted și lucios. Cresc sub forma de “cirochini” sau gramezi iar diametrul este de 2-3 mm. Formează o zonă îngustă de β -hemoliză, culoarea este specifică celulelor mature și se datorează pigmentilor din beta caroten, de asemenea pe mediul Chapman formează colonii galbene datorită fermentării manitolului.

❖ Teste biochimice

Testul bacteriologic utilizează:

- ✓ Teste de diferențiere stafilococi vs streptococi
 - reacția la catalază: este evaluată prezența sau absența catalazei, pe o lamă de microscop de adaugă 1 ml de apă oxigenată și o probă din mediul de cultură fără sânge, dacă reacția decurge cu eliberare de gaz, atunci proba indică prezența stafilococilor (și a micrococilor) și exclude prezenta streptococilor, care sunt catalazo-negativi.

- ✓ Teste de diferențiere stafilococi vs micrococi
 - reacția la bacitracină: stafilococii sunt rezistenți iar micrococii sunt sensibili;
 - reacția la furazolidon: stafilococii sunt sensibili iar micrococii sunt rezistenți.
- ❖ Teste de diferențiere ale diferitelor specii de stafilococi (*S.aureus* vs alte tulpini stafilococice)

Tabelul 3. Reacții de diferențiere între stafilococi

Tipul de reacție	<i>S.aureus</i>	Toate celelalte tulpini stafilococice
Reacția la coagulază	coagulazo-pozitiv <i>S.aureus</i> este singura tulpină stafilococică coagulazo-pozitivă, secretă două tipuri de coagulaze: coagulaza liberă și coagulaza legată, numită și „clumping factor”.	coagulazo-negativ
Reacția de fermentare a manitolului	<i>S.aureus</i> fermentează manitolul și modifică culoarea mediului din roz în galben	negativ
Prezența proteinei A	pozitiv	negativ
Prezența termonucleazei	pozitiv	negativ
Prezența ADN-azei	pozitiv	negativ
Prezența fosfatazei	pozitiv	negativ
Procesul de lichefiere a gelatinei	pozitiv	negativ
Reacția la novobiocin (test de diferențiere a stafilococilor coagulazo-negativi)	pozitiv	<i>S.epidermidis</i> : pozitiv <i>S.saprophyticus</i> : negativ (rezistent)

❖ Sensibilitate la antibiotice

Se recomanda antibioterapia, prezintă sensibilitate crescută la beta-lactamine și macrolide.

2. GENUL *STREPTOCOCCUS*

STREPTOCOCI α -HEMOLITICI

Reprezentanți: *STREPTOCOCCUS VIRIDANS* și *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Diagnosticul de laborator al streptococilor α -hemolitici

Diagnosticul infecției invazive cu streptococii α -hemolitici cuprinde mai multe etape, descrise mai jos.

Diagnosticul de laborator este de tip **bacteriologic**.

❖ Recoltare

Proba bacteriană se recoltează din lichide, care sunt în mod normal sterile, funcție de localizarea infecției (ex: exudat, spută, sânge etc).

❖ Transport

Imediat după recoltare proba se transportă către laborator unde este inoculată pe un mediu de cultură adecvat, transportul se va efectua într-un mediu specific streptococilor, *mediul Pick* sau *bulion Todd-Hewitt*, care nu permite dezvoltarea altor specii microbiene.

❖ Identificare

Identificarea streptococilor α -hemolitici se realizează atât direct cât și prin însămânțarea probei pe un mediu de cultură cu evaluarea caracterelor culturale și a structurii antigenice.

❖ Evaluare macroscopică și microscopie (examen direct)

S.pneumoniae, la nivel macroscopic se poate observa o colorație ruginită a sputei iar la nivel microscopic se observă atât celulele polimorf nucleare cât și pneumococii dispuși sub formă de diplococi încapsulați.

❖ Izolarea și cultivare:

Produsele biologice se cultivă pe mediul geloză-sânge și se incubează plăcile de cultură la 37°C timp de 24 de ore. Deoarece streptococii sunt catalazo-negativi, se folosesc medii de cultură pe bază de sânge.

❖ Morfologie și caractere culturale

Sunt coci gram pozitivi, catalazo-negativi, ce sunt dispuși sub formă de lanțuri sau perechi. Pe mediul geloză-sânge formează hemoliză parțială de tip α cu colorarea mediului în verde (excepție: anumite specii de *S. viridans* care sunt nehemolitice);

S.pneumoniae are următoarele caracteristici: este un coc gram pozitiv, capsulat sau necapsulat, are formă ovală, lanceolată sau formă de "flacăra", dispuși sub formă de diplococi, formând lanțuri scurte pe mediul de cultură, de regulă sunt capsulați. Celulele îmbătrânite din mediul de cultură formează o autoliză centrală în interiorul coloniilor, celulele încep să elibereze autolizine cu efecte autolitice, iar forma lor se aplatizează. Pneumococul produce o pneumolizină care este de fapt responsabilă de α -hemoliză; sunt solubili în săruri biliare 10% și produc turbiditate uniformă.

S. viridans (subsp *S.milleri*) are următoarele particularități: este un coc gram pozitiv cu formă ovală sau rotundă, ce formează lanțuri lungi, colonii cu aspect convex, este lipsit de capsulă. Au un miros caracteristic de caramel și nu cresc în medii de cultură cu adăugare de NaCl 6.5% (comparativ cu enterococii)

și nu au antigen de grup, sunt insolubili în săruri biliare (comparativ cu pneumococii care sunt solubili) și produc turbiditate granulară.

❖ **Teste biochimice:**

Testul bacteriologic utilizează:

- ✓ Teste de diferențiere streptococi vs stafilococi
 - reacția la catalază (similar cu identificarea stafilococilor), este evaluată prezența sau absența catalazei, streptococii sunt catalazo negative. Dacă reacția decurge fără eliberare de gaz, atunci proba indică prezența streptococilor și exclude prezența stafilococilor; acest aspect ajută la diferențierea streptococilor de stafilococi.

- ✓ Teste de diferențiere *Streptococcus pneumoniae* vs *Streptococcus viridans*

Tabelul 4. Reacții de diferențiere a streptococilor α -hemolitici

Tipul de reacție	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus viridans</i>
Testul la optochin	pozitiv (sensibilitate crescută)	negativ (rezistent)
Testul la bilă esculin	pozitiv	negativ
Reacția de fermentare a inulinei	pozitiv	negativ

- ✓ **Teste de identificare:** API® Strep, testul de aglutinare cu latex sau teste de serotipare - prin care se poate depista tipul serologic al pneumococului.

❖ Sensibilitate la antibiotice

Se recomandă antibioterapia, prezintă sensibilitate crescută la beta-lactamine și macrolide.

STREPTOCOCI β -HEMOLITICI

Reprezentanti: ***STREPTOCOCCUS PYOGENES***, ***STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

Diagnosticul de laborator al streptococilor β -hemolitici

Diagnosticul de laborator este bacteriologic (toate speciile) și serologic cu determinarea anticorpilor antistreptococici (*Streptococcus pyogenes*)

Diagnosticul infecției invazive cu streptococul β -hemolitic cuprinde mai multe etape, descrise mai jos.

❖ Recoltare

Probele se recoltează din diferite fluide biologice, care sunt în mod normal sterile, funcție de localizarea infecției:

- exudat faringian (dimineața, pe stomacul gol) sau nazofaringian, secreții purulente sau lichid vezicular (din leziuni cutanate) cu un tampon steril, sânge, urină, lichid cefalorahidian (*S.pyogenes*),
- secreții vaginale sau lichid lichid cefalorahidian (*S.agalactiae*)

Se va alege cel mai relevant loc în vederea recoltării probei, funcție de localizarea infecției.

❖ Transport

Imediat după recoltare proba se transportă către laborator unde este inoculată pe un mediu de cultura adecvat. Transportul se va efectua într-un mediu specific streptococilor: *mediul Pick* sau *bulion Todd-Hewitt*, care nu permite dezvoltarea altor specii microbiene.

❖ **Identificare**

Identificarea streptococilor β -hemolitici se realizează atât direct cât și prin însămânțarea probei pe un mediu de cultură cu evaluarea caracterelor culturale și a structurii antigenice.

❖ **Evaluare macroscopică și microscopică (examen direct)**

Examenul macroscopic reflectă un aspect turbure al lichidului cefalorahidian sau un aspect seros al puroiului.

Examenul microscopic se efectuează pe frotiu direct și se observă cocii gram pozitivi dispuși în lanțuri scurte, dar examenul este nespecific și neconcludent pentru identificarea streptococilor β .

❖ **Izolare și cultivare**

Izolarea agentului patogen se va realiza pe medii de cultură speciale, adecvate de tip geloză-sânge (deoarece streptococii sunt catalazo-negativi, se folosesc medii de cultură pe bază de sânge) și îmbogățite cu diferite substanțe și se incubează la 37°C timp de 24 de ore.

Proba este însămânțată în general pe medii selective precum:

- mediul geloză-sânge de oaie 5%,
- mediul SSP: mediul geloză-sânge cu cristal violet, acid nalidixic, glucoză, geloză,
- bulion Todd-Hewitt,
- medii lichide cu depozit de pulbere.

❖ **Morfologie și caractere culturale**

Sunt coci gram pozitivi, catalazo-negativi și facultativ anaerobi, sunt nesporulați, încapsulați iar pe mediul de cultură au aspect de lanțuri. Pe mediul geloză sânge produc colonii circulare.

S.pyogenes produc coloniile au un diametrul mic, de 0.5-1 mm, cu aspect pulverulent și o hemoliză completă și largă de tip β , au forme variabile, de la rotunde, la plate cu aspect opac sau lucios. Tulpinile care nu produc hemolizina S însă produc hemolizina O, vor realiza o β -hemoliză doar în condiții anaerobe.

S.agalactiae produc coloniile de culoare alb-cenușie, cu diametrul mai mare, de 2mm și o zonă variabilă și incompletă de β -hemoliză, zona de β -hemoliză este mai îngustă, 11% din colonii pot fi nehemolitice.

❖ Teste biochimice

Testul bacteriologic utilizează:

✓ Teste de diferențiere streptococi vs stafilococi

- reacția la catalază (similar cu identificarea stafilococilor și a streptococilor α -hemolitici), este evaluată prezența sau absența catalazei; streptococii sunt catalazo negative. Dacă reacția decurge fără eliberare de gaz, atunci proba indică prezența streptococilor și exclude prezența stafilococilor, acest aspect ajută la diferențierea streptococilor de stafilococi;
- teste care au la baza reacția antigen-anticorp (ex: reacții de precipitare sau aglutinare/latex-aglutinare).

❖ Teste de diferențiere *S.pyogenes* vs *S.agalactiae*

Tabelul 5. Reacții de difențiere a streptococilor β -hemolitici

Tipul de reacție	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Testul la bacitracină	pozitiv Este o metoda selectivă pentru streptococii de grup A, excluzându-se astfel alte infecții cu alte tulpini streptococice	negativ (rezistent)
Testul CAMP	negativ	pozitiv S. agalactiae produce factorul CAMP, o proteină termostabilă care are capacitatea de a intensifica zona de hemoliză incomplete, această hemoliză este produsă de o β -hemolizină, care la rândul ei este produsă de o tulpina a sp. <i>S.aureus</i> . Testul CAMP nu este specific doar streptococilor de grup B, ci și altor tipuri de specii streptococice.
Testul la L-pirolidonil arilamidaza (PYR)	pozitiv	negativ
Testul de hidroliză a hipuratului	negativ	pozitiv

Testul serologic identifică prezența anticorpilor:

- antistreptolizina O (ASLO), titrul crescut de anticorpi ASLO (mai mare de 200U/ml) este corelat cu majoritatea infecțiilor recente cu *Streptococcus pyogenes*. Acest tip de diagnostic este utilizat în

vederea diagnosticării complicațiilor infecției (ex: febra reumatică), ASLO sunt frecvent corelați cu patologiile de tip respirator (ex: amigdalite, faringite – cel mai frecvent test serologic).

- anti-streptokinaza, anti-hialuronidaza și anti-DNaza sunt alte teste serologice utilizate, dar mai puțin frecvent (ex: anti-DNaza mai mare de 300-350UI/ml este asociată cu piodermita și glomerulonefrita).

❖ Sensibilitatea la antibiotice

Se recomandă antibioterapia, prezintă sensibilitate crescută la beta-lactamine și macrolide.

VII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE BACILI

1. GRAM POZITIVI AEROBI (GENUL *CORYNEBACTERIUM*, *LISTERIA*, *ERYSIPELOTHRIX*)

Bacteriile încadrate în grupul bacililor aerobi Gram-pozitivi includ genul *Bacillus*, caracterizat prin capacitatea de a forma spori, precum și un ansamblu de genuri nesporulate, precum *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Rhodococcus*, *Listeria*, *Erysipelothrix* și *Gardnerella*. În aceeași categorie sunt incluse și actinomicetele aerobe ramificate, reprezentate în principal de genul *Nocardia*.

1.1. Genul *Corynebacterium*

Genul *Corynebacterium* reprezintă un grup heterogen de bacterii aparținând familiei Actinomycetaceae, care cuprinde atât specii patogene pentru om și animale, cât și forme saprofite sau agenți patogeni ai plantelor. Majoritatea speciilor colonizează în mod obișnuit pielea și mucoasele organismelor gazdă, fiind prezente la nivelul tractului respirator, gastrointestinal și urogenital.

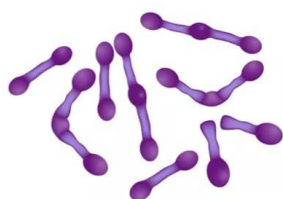
Cel mai important agent patogen al acestui gen este *Corynebacterium diphtheriae*, intens studiat și bine caracterizat din punct de vedere microbiologic și patogenic. Alături de acesta, speciile *Corynebacterium ulcerans* și *Corynebacterium pseudotuberculosis* sunt considerate patogene majore, fiind singurele capabile să producă toxina difterică, datorită unor trăsături biochimice comune.

Difteria este o infecție acută, localizată predominant la nivelul tractului respirator superior sau al tegumentelor, determinată de *Corynebacterium diphtheriae*. Tulpinile toxigenice ale acestei specii secretă o exotoxină proteică responsabilă de efecte sistemice severe, incluzând miocardita și polineuropatia.

1.1.1. *Corynebacterium diphtheriae*

Denumirea *Corynebacterium diphtheriae* derivă din termenii grecești „koryne”, care semnifică „măciucă”, și „diphthera”, care înseamnă „piele”, făcând referire la aspectul pseudomembranei coriacee formate la nivel faringian în cursul infecției.

Din punct de vedere morfologic, *C. diphtheriae* este un bacil Gram-pozitiv, neîncapsulat, imobil și nesporulat. Celulele bacteriene prezintă o formă caracteristică de măciucă și tind să se dispună în aranjamente tipice sub formă de palisade sau în unghiuri variate, conferind aspectul descris clasic ca „litere chinezești”.



Corynebacterium diphtheriae



Figura 5. *Corynebacterium diphtheriae*-coloratie gram

Difteria

Difteria este o boală infecțioasă acută, extrem de contagioasă, specifică în special copilăriei, care afectează predominant mucoasa orofaringiană și, mai rar, cea nazală sau tegumentară. Agentul etiologic principal este *Corynebacterium diphtheriae*.

Tulpinile toxigenice ale acestei bacterii produc o exotoxină potentă, responsabilă de manifestările clinice și complicațiile sistemice ale bolii. Tabloul clinic include faringită, febră și edem al regiunii cervicale sau al zonei afectate cutanat. Leziunile caracteristice sunt acoperite de o pseudomembrană aderentă. Odată eliberată, toxina difterică se diseminează hematogen, putând determina afectări severe, precum miocardită, insuficiență cardiacă congestivă și polineuropatie.

Difteria este o boală endemică cunoscută din antichitate. Principala sursă de infecție este reprezentată de purtătorii aparent sănătoși (aproximativ 95% din cazuri), care pot fi temporari (până la o lună) sau cronici (până la un an). Purtătorii nazali prezintă un risc epidemiologic mai mare comparativ cu cei orofaringieni, datorită eliminării mai frecvente a bacteriei.

Transmiterea se realizează în principal pe cale aerogenă, prin inhalarea aerosolilor contaminați, și mai rar prin contact direct cu leziuni cutanate infectate. Omul constituie singurul rezervor de infecție. Boala apare cel mai frecvent la copiii cu vârste între 1 și 5 ani, în timp ce nou-născuții beneficiază, de regulă, de protecție pasivă conferită de anticorpii materni.

Agentul patogen se transmite prin secrețiile nazofaringiene, colonizează mucoasa nazofaringiană sau tegumentele și poate supraviețui timp îndelungat în mediul extern, inclusiv în praf și în condiții de uscăciune.

Mecanismul patogenic principal al toxinei difterice constă în inhibarea sintezei proteice la nivel celular, ceea ce explică efectele necrotice și neurotoxice. Organele țintă principale sunt inima, sistemul nervos și rinichii. Necroza celulară determină formarea pseudomembranei faringiene caracteristice. De asemenea, și alte specii toxigenice de *Corynebacterium*, precum *Corynebacterium ulcerans*, pot produce tablouri clinice similare. Există și forme clinice mai ușoare, determinate de tulpini netoxigene, care pot mima faringita streptococică și pot evolua fără formarea pseudomembranei.

Purtătorii asimptomatici joacă un rol esențial în menținerea lanțului epidemiologic.

Imunitatea antitoxică se dezvoltă fie în urma infecției naturale, fie prin vaccinare cu toxoid difteric. Aceasta conferă protecție împotriva bolii, însă nu previne starea de purtător.

Recoltarea probelor

Diagnosticul de laborator urmărește identificarea *Corynebacterium diphtheriae* din probe biologice și confirmarea infecției. Deoarece boala afectează în principal tractul respirator superior, se recoltează exsudate din orofaringe, nazofaringe sau, în anumite cazuri, din conductul auditiv. În prezența pseudomembranei, este indicată recoltarea de material de sub aceasta, precum și, dacă este posibil, a unui fragment tisular.

Recoltarea trebuie efectuată cât mai precoce, ideal înainte de inițierea terapiei antimicrobiene sau a administrării antitoxinei. Probele trebuie transportate rapid la laborator sau, în caz contrar, păstrate la 4–8°C până la procesare.

În laborator, probele sunt cultivate pe medii selective adecvate, precum cele care conțin telurit (Löffler, Hoyle, Tinsdale), pentru izolarea și identificarea bacilului difteric.

Izolarea bacteriei

Probele sunt însămânțate pe agar-sânge și pe medii selective cu telurit, precum mediile Tinsdale, Hoyle sau Gundel-Tietz. În absența mediilor selective, se pot utiliza discuri de fosfomicină aplicate pe agar-sânge pentru inhibarea florei bacteriene asociate.

Dacă proba nu a fost inițial inoculată într-un mediu de îmbogățire (de tip OCST), se recomandă inocularea și în mediul Löffler, care conține ser

coagulat de vițel și favorizează dezvoltarea *C. diphtheriae*. Ulterior, tamponanele sunt incubate în medii lichide îmbogățite cu ser și sânge timp de 24 de ore, urmate de cultivare pe medii cu telurit.

Identificarea bacilului difteric

Specimen: exsudat faringian (unul sau două tamponane), care conține material fibrinos și fragmente de pseudomembrană.

Examen microscopic (frotiu direct):

- **Colorația Gram:** *C. diphtheriae* apare sub formă de bacili Gram-pozitivi, pleomorfi, cu colorație neuniformă, dispuși caracteristic în palisade sau în aranjamente cuneiforme (în formă de V sau L), conferind aspectul de „litere chinezești”. Diferențierea față de alte corynebacterii comensale poate fi dificilă.
- **Colorația Albert:** metodă mai specifică, în care bacteriile apar ca bacili verzi, prezentând granule metacromatice de culoare negru-albăstruie.

Exemple de medii speciale utilizate pentru izolarea *Corynebacterium diphtheriae*

(E-ÎMBOGĂȚIT, S-SELECTIV, MEDII D-DIFERENȚIALE):

- Mediu seric Loeffler (E)
- Agar telurit de potasiu (S)

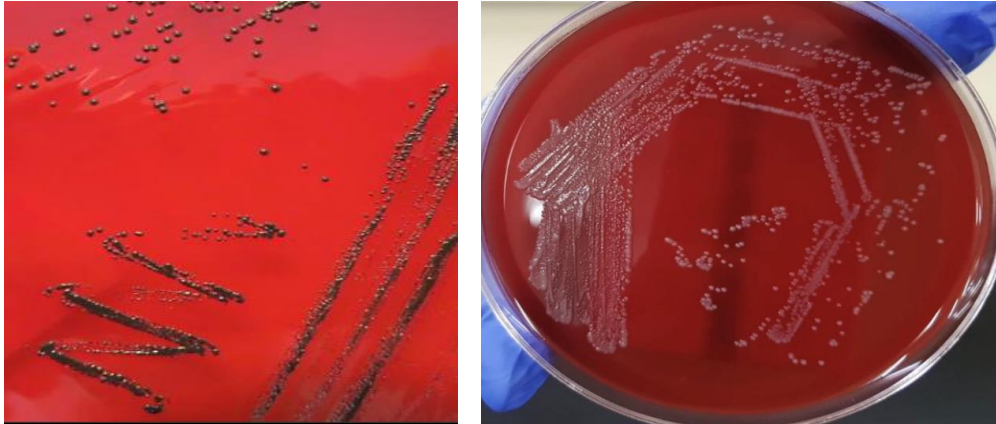


Figura 6. *C. diphtheriae* pe mediu telurit Hoyle și *C. diphtheriae* pe mediu agar-sânge.

Identificarea. Microscopie

Caracteristici morfologice și structurale

Corynebacterium diphtheriae este un bacil Gram-pozitiv, marcat pleomorf, care poate prezenta o varietate de forme celulare. Dispunerea bacteriilor este caracteristică, acestea apărând fie în palisade (celule aliniate paralel), fie izolat, formând unghiuri ascuțite între ele, cu aspecte tipice în „V” sau „L”, descrise clasic ca „litere chinezești”.

Colorarea bacteriei este adesea neuniformă, mai ales în preparatele colorate cu albastru de metilen, conferind un aspect granulat sau „în mărgel”. În citoplasmă pot fi evidențiate incluziuni metacromatice intens colorate, cunoscute sub denumirea de granule Babès–Ernst, care reprezintă depozite de polifosfați. Prezența acestora reflectă starea metabolică a celulei și depinde de condițiile de cultură.

Caractere de cultură

C. diphtheriae este o bacterie aerobă sau facultativ anaerobă, care se dezvoltă optim la 37°C și la un pH cuprins între 7,4 și 7,6.

- **Mediul Löffler** (ser coagulat de bou, cu adaos de glucoză 1%) favorizează creșterea rapidă, bacteriile formând colonii albicioase, lucioase, asemănătoare unor picături de ceară.
- **Mediile cu telurit** (precum Tinsdale, Hoyle sau Gundel-Tietz) sunt selective și diferențiale:

Pe **mediul Tinsdale**, după 24–48 de ore de incubare la 37°C, *C. diphtheriae* formează colonii mici, gri-negricioase, înconjurate de un halou brun, rezultat în urma producerii de H₂S și reacției acestuia cu sărurile de telurit.

Specia *Corynebacterium ulcerans* produce un halou mai intens.

Reducerea teluritului de potasiu la telur metallic conferă coloniilor culoarea neagră.

- Pe **mediul Gundel-Tietz**, în funcție de aspectul coloniilor, se disting trei biotipuri principale de *C. diphtheriae*:
 - **gravis**: colonii mari, negre, cu suprafață granulată, margini crenelate și striții radiale („aspect de margaretă”);
 - **mitis**: colonii mai mici, netede, cu margini regulate;
 - **intermedius**: colonii cu caractere intermediare, ușor granulare, cu centru discret proeminent și margini regulate.
- Pe **agar-sânge**, coloniile sunt rotunde, friabile, ușor granulare, de culoare alb-gri.

Toxigenza și diagnosticul de laborator

Patogenitatea *C. diphtheriae* este determinată în principal de producerea toxinei difterice, astfel încât simpla izolare a bacteriei nu este suficientă pentru confirmarea diagnosticului. Este necesară demonstrarea capacității de toxigenză.

Metode de evidențiere a toxinei:

- **Teste in vivo** (istoric utilizate): inoculare la cobai (subcutanat sau intracutanat);

- Teste in vitro:

- testul Elek (imunodifuzie în gel);
- detectarea genei tox prin PCR;
- detectarea toxinei prin metode imunologice (ELISA, teste imunocromatografice);
- evaluarea efectului citotoxic pe culturi celulare.

Sensibilitatea la antibiotice și tratament

C. diphtheriae este, în general, sensibilă la antibiotice active împotriva bacteriilor Gram-pozitive, precum penicilina, eritromicina sau vancomicina, însă prezintă frecvent rezistență la sulfonamide.

Tratamentul difteriei este în principal unul imunologic, constând în administrarea de antitoxină difterică pentru neutralizarea toxinei circulante. Antibioterapia este utilizată atât pentru tratarea pacientului, cât și pentru profilaxia contactilor, cu scopul reducerii transmiterii.

Alte specii de *Corynebacterium*

Pe lângă *C. diphtheriae*, există numeroase specii de *Corynebacterium* nedifterice (nondiphtheriae), dintre care unele au relevanță clinică:

- *Corynebacterium ulcerans* – poate produce infecții respiratorii similare difteriei, inclusiv forme toxigene;
- *Corynebacterium pseudotuberculosis* – patogen la animale (în special ovine și cabaline), rar implicat în infecții umane;
- *Corynebacterium minutissimum* – agent etiologic al eritrasmei;
- *Corynebacterium jeikeium* – specie oportunistă, adesea multidrog-rezistentă, implicată în infecții nosocomiale;
- *Corynebacterium parvum* (în prezent reclassificat ca *Cutibacterium acnes*) – utilizat experimental ca imunomodulator.

1.2. Genul *Listeria*

Listerioza reprezintă o infecție sporadică, cu caracter zoonotic, care afectează atât animalele, cât și omul, în special categoriile vulnerabile precum gravidele, nou-născuții, vârstnicii și persoanele imunocompromise. Agentul etiologic principal este *Listeria monocytogenes*.

Aceasta este cea mai importantă specie patogenă a genului *Listeria*, fiind responsabilă de majoritatea infecțiilor umane. Transmiterea se realizează în principal pe cale alimentară, prin consumul de produse contaminate (lapte nepasteurizat, legume crude, carne insuficient preparată sau produse procesate contaminate). De asemenea, transmiterea verticală, de la mamă la făt, este bine documentată. *Listeria ivanovii* poate produce ocazional infecții la om, în timp ce speciile *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* și *Listeria seeligeri* sunt considerate nepatogene pentru om. Aproximativ 5% dintre adulții sănătoși pot fi purtători intestinali de *Listeria spp.*

Deși incidența în populația generală este redusă, infecțiile cu *Listeria monocytogenes* pot avea evoluții severe, determinând bacteriemie și meningoencefalită, în special la persoanele cu risc crescut.

Caracteristici clinice

În cursul sarcinii, listerioza este rar întâlnită înainte de săptămâna a 20-a de gestație. Ulterior, infecția maternă poate evolua asimptomatic sau cu manifestări nespecifice, precum febră, lombalgii, cefalee, dureri faringiene sau stare generală alterată. Febra maternă poate avea consecințe severe asupra fătului, incluzând reducerea mișcărilor fetale, travaliu prematur, avort spontan, naștere de făt mort sau infecție neonatală precoce.

Boala neonatală precoce (debut <5 zile de la naștere) se manifestă de obicei prin septicemie severă, având o mortalitate ridicată (30–60%). Dintre supraviețuitori, 20–40% pot dezvolta sechele pe termen lung, precum afectări pulmonare sau neurologice. Boala neonatală tardivă (debut >5 zile) se prezintă frecvent sub formă de meningită, fiind adesea dobândită nosocomial și având o mortalitate mai redusă.

La adulți, principalele forme clinice includ meningita, septicemia și endocardita. Manifestările mai rare cuprind encefalita, abcesele cerebrale sau ale sistemului nervos central, artrita, hepatita, endoftalmita, gastroenterita și pneumonia.

Factorii de risc majori includ vârsta înaintată și imunodepresia (indusă de corticoterapie, tratamente citotoxice sau infecția cu HIV). Mortalitatea rămâne ridicată, iar o proporție semnificativă dintre supraviețuitorii infecțiilor sistemului nervos central prezintă sechele neurologice persistente, precum hemiplegia.

Factori de virulență și patogeneză

Listeria monocytogenes este un patogen intracelular facultativ, capabil să supraviețuiască și să se multiplice în interiorul celulelor gazdă. Virulența sa este determinată de o serie de factori, printre care:

- **Listeriolizina O** – o hemolizină esențială care permite distrugerea membranei fagosomului și evadarea bacteriei în citoplasmă;
- **Fosfolipazele C** – implicate în liza membranelor celulare;
- **Catalaza și superoxid dismutaza** – contribuie la rezistența împotriva stresului oxidativ;
- **Proteina de suprafață p60** – implicată în aderență și facilitarea fagocitozei.

Listeriolizina O este un determinant major al virulenței, iar tulpinile nehemolitice sunt, în general, avirulente și incapabile de răspândire intracelulară. După pătrunderea în celule, bacteria se răspândește direct de la o celulă la alta prin polimerizarea actinei gazdei, evitând astfel răspunsul imun umoral.

Recoltarea probelor

Produsele patologice recoltate depind de localizarea infecției și pot include sânge, lichid cefalorahidian (LCR), lichid amniotic, placentă, probe tisulare, materii fecale sau exsudate din plăgi. De asemenea, pot fi investigate probe alimentare suspecte și probe din mediul de procesare a alimentelor.

Izolarea bacteriei

Diagnosticul de certitudine al listeriozei se bazează pe izolarea *Listeria monocytogenes* din sânge, LCR sau din alte produse patologice relevante. Bacteria este catalază-pozitivă, β -hemolitică, mobilă la temperatura camerei și capabilă să hidrolizeze esculina.

Temperatura optimă de creștere este de 30–35°C, însă microorganismul poate prolifera într-un interval larg (0,5–45°C), inclusiv la temperaturi de refrigerare. Această proprietate permite utilizarea tehnicii de **îmbogățire la rece**, care constă în incubarea probelor în bulion la 4°C timp de mai multe săptămâni, cu subcultivări periodice. Totuși, această metodă are utilitate clinică limitată, deoarece diagnosticul și tratamentul trebuie instituite rapid.

În preparatele proaspete (pe lamă umedă), *L. monocytogenes* prezintă o motilitate caracteristică de tip „tumbling” (rostogolire). În mediile de motilitate, la 22–25°C, se observă un model tipic de creștere în „umbrelă”, absent la 35°C. Bacteria este pozitivă pentru hidroliza hipuratului și a esculinei în prezența bilei și determină o reacție CAMP pozitivă.

Pentru izolarea selectivă se utilizează medii speciale, precum agarul PALCAM.

Identificare

Listeria monocytogenes este un bacil Gram-pozitiv, facultativ anaerob, nesporulat, capabil să se dezvolte într-un interval larg de temperatură, inclusiv la temperaturi scăzute. Motilitatea este evidentă la temperaturi joase, dar diminuată la 37°C.

Majoritatea infecțiilor umane sunt cauzate de serotipurile 1/2a, 1/2b și 4b.

Pe agar-sânge, bacteriile formează colonii slab β-hemolitice, hemolizina fiind un factor important de patogenitate. În frotiurile directe, microorganismul apare ca un coccobacil Gram-pozitiv; în culturile subsecvente, celulele pot deveni mai coccoide, iar culturile vechi pot prezenta aspect Gram-variabil.

Disponerea bacteriilor poate fi izolată, în lanțuri scurte sau în palisade. În funcție de morfologie, *L. monocytogenes* poate fi confundată cu streptococii

(în formele coccoide) sau cu corynebacteriile (în formele bacilare). De regulă, bacteriile nu sunt ușor evidențiable în frotiurile din lichid cefalorahidian.

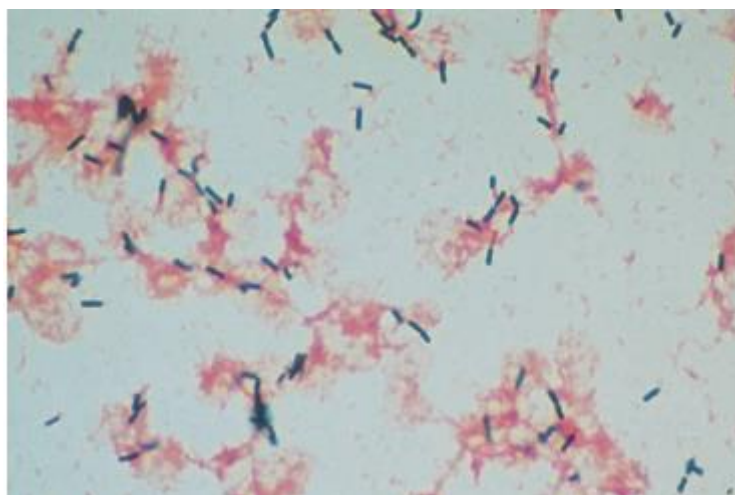


Figura 7. Colorația Gram a *Listeria monocytogenes* în sânge.

Caracteristici culturale

Listeria monocytogenes se dezvoltă eficient pe medii uzuale de cultură, precum agar-sânge (SBA), agar-ciocolată, agar nutritiv și în medii lichide de tip bulion. Pentru izolarea optimă, microorganismul preferă o atmosferă cu o concentrație ușor crescută de dioxid de carbon (CO₂).

Coloniile sunt de dimensiuni mici, cu formă rotundă, suprafață netedă și aspect translucid. Acestea sunt înconjurată de o zonă îngustă de β-hemoliză, care devine mai evidentă după îndepărtarea coloniei de pe suprafața mediului. Aspectul coloniilor și tipul de hemoliză sunt similare celor produse de *Streptococcus agalactiae*.



Figura 8. Cultură *Listeria monocytogenes* pe mediu de sânge-agar.

Sensibilitatea la antibiotice.

În cadrul tratamentului infecțiilor cu *Listeria monocytogenes*, ampicilina reprezintă terapia de primă linie, fiind frecvent administrată în asocieră cu un aminoglicozid, precum gentamicina, pentru obținerea unui efect sinergic bactericid.

În cazul pacienților cu alergie la peniciline, macrolidele (de exemplu, eritromicina sau azitromicina) pot constitui alternative terapeutice, deși utilizarea lor este mai limitată. În formele severe de infecție, poate fi indicată administrarea de carbapeneme, precum meropenem.

Evaluarea sensibilității la antibiotice se realizează prin metode standardizate, incluzând testul de difuzie pe disc (Kirby–Bauer) și tehnici de diluție pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI).

Listeria monocytogenes prezintă rezistență intrinsecă la cefalosporine și poate manifesta variabilitate în sensibilitatea față de alte clase de antibiotice, motiv pentru care monitorizarea profilului de susceptibilitate este esențială în ghidarea terapiei adecvate.

1.3. Genul *Erysipelothrix*

Genul *Erysipelothrix* cuprinde trei specii recunoscute: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelothrix tonsillarum* și *Erysipelothrix inopinata*. Dintre acestea, *E. rhusiopathiae* este singura specie implicată în patologia umană.

Această bacterie a fost izolată inițial de către Robert Koch în anul 1878, din șoareci, și ulterior de Louis Pasteur în 1882, din porci. Rolul său ca agent patogen pentru om a fost recunoscut în anul 1909.

E. rhusiopathiae este un bacil Gram-pozitiv, pleomorf, nesporulat, catalază-negativ, caracterizat prin tendința de a forma filamente lungi. Din punct de vedere metabolic, este un microorganism aerob sau facultativ anaerob, nemobil. Poate apărea dispus individual, în lanțuri scurte sau în forma caracteristică de „V”, asemănătoare corynebacteriilor. De remarcat este faptul că se poate decolora ușor în timpul colorației Gram, prezentând uneori aspect Gram-variabil.

Distribuția sa este largă la nivel global, fiind întâlnită ca agent comensal sau patogen la numeroase vertebrate și nevertebrate, inclusiv porci domestici, păsări și pești. Porcul este considerat principalul rezervor al infecției. Transmiterea la om are loc, de regulă, prin contact direct cu animale sau produse de origine animală contaminate, în special prin soluții de continuitate ale tegumentului (tăieturi, zgârieturi). Infecțiile sunt asociate frecvent cu expunerea profesională, afectând în special persoanele care lucrează în industria cărnii, pescuit sau manipularea produselor animale.

Bacteria prezintă o rezistență remarcabilă în mediu, supraviețuind în apă, sol și materiale organice, precum și în condiții de sărare, afumare sau murare.

Din punct de vedere clinic, *E. rhusiopathiae* determină trei forme principale de boală la om:

- erizipeloidul (forma cutanată localizată);
- infecția cutanată difuză;
- septicemia, frecvent asociată cu endocardită.

Erizipeloidul reprezintă cea mai frecventă manifestare clinică și constă într-o infecție cutanată localizată, asemănătoare erizipelului streptococic. Leziunile sunt localizate în special la nivelul mâinilor și degetelor. Perioada de incubație este de 2–7 zile. Clinic, se observă o zonă eritematoasă violacee, bine delimitată, ușor reliefată, care se extinde periferic și este însoțită de durere și edem. Pot apărea manifestări sistemice precum febră, artralgiile, limfangită și limfadenopatie.

Această formă este, în general, autolimitantă, cu vindecare în 3–4 săptămâni, deși pot apărea evoluții prelungite sau recidive. Infecțiile sistemice sunt rare și doar excepțional evoluează din erizipeloid. Endocardita poate apărea atât la pacienți cu proteze valvulare, cât și la cei cu valve native aparent sănătoase.

Recoltarea probelor se efectuează din surse variate, în funcție de context: tegumente, sânge și țesuturi de la animale, probe de mediu (sol, apă), precum și biopsii cutanate, sânge sau alte fluide biologice de la pacienți.

Izolarea bacteriei se realizează pe medii de cultură uzuale, în special agar sânge, unde formează colonii mici, translucide, ușor umede. Mediile precum agar tripticază-soia (TSI) pot fi utilizate pentru evidențierea fermentării glucidelor și a producerii de hidrogen sulfurat (H_2S), o caracteristică importantă a speciei. Incubarea se face la 35–37°C, timp de 24–48 de ore, în condiții aerobe sau anaerobe facultative (creșterea poate fi mai bună în condiții anaerobe).

Identificarea se bazează pe caracteristici morfologice și biochimice.

E. rhusiopathiae este:

- catalază-negativă,
- urează-negativă,
- Voges-Proskauer negativă,
- incapabilă de hidroliza esculinei,
- pozitivă pentru producerea de H_2S .

Un element distinctiv este modelul de creștere în mediu cu gelatină la aproximativ 22°C, unde formează un aspect caracteristic „test-tube brush” (perie de eprubetă). Acesta apare datorită dezvoltării bacteriei de-a lungul liniei de inoculare, cu extensii laterale fine, conferind un aspect filamentar.

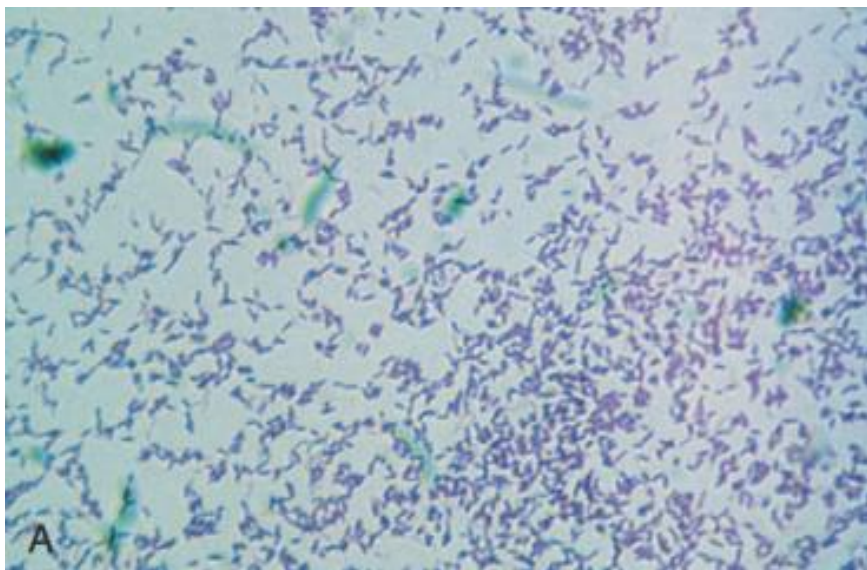


Figura 9. Colorația Gram a *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Caracteristici de cultură

Specimenele biologice utilizate în mod obișnuit pentru izolarea *Erysipelothrix rhusiopathiae* includ biopsii tisulare și aspirate provenite din leziuni cutanate. Aceste probe sunt inoculate inițial într-un bulion nutritiv suplimentat cu 1% glucoză și incubate la 35°C, într-o atmosferă îmbogățită cu aproximativ 5% CO₂.

Microorganismul se poate dezvolta și pe medii de cultură uzuale, precum agarul sânge (SBA) și agarul ciocolată. Pentru o izolare optimă, se recomandă realizarea de subculturi zilnice pe plăci de agar sânge.

După 24 de ore de incubare pe agar sânge, coloniile sunt, în general, mici, punctiforme și nehemolitice. După 48 de ore, pot fi observate două tipuri morfologice distincte de colonii:

- un tip de colonii mici, netede, transparente, lucioase, convexe, cu margini regulate;
- un tip de colonii mai mari, rugoase, plate, cu suprafață mată, aspect încrêțit și margini neregulate.

În cursul unei incubări prelungite, coloniile pot prezenta o hemoliză de tip α . De asemenea, *E. rhusiopathiae* poate fi izolat din medii de hemocultură în cazul infecțiilor sistemice.

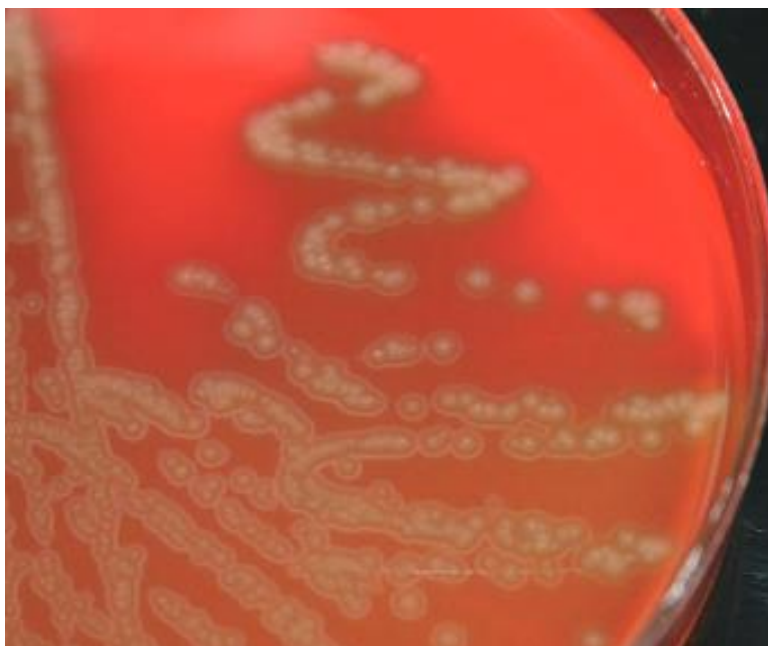


Figura 10. Cultură *Erysipelothrix* pe agar-sânge (SBA) după 24 de ore de incubare.

Sensibilitatea la antibiotice.

Penicilina G reprezintă antibioticul de primă linie în tratamentul infecțiilor cu *Erysipelothrix rhusiopathiae*, datorită sensibilității ridicate a microorganismului la această clasă de antibiotice. Ca alternative terapeutice pot fi utilizate cefalosporinele de generația a III-a, precum ceftriaxona și cefotaxima. În cazul pacienților cu alergie la penicilină, macrolidele, cum ar fi eritromicina și claritromicina, constituie opțiuni adecvate.

Deși rezistența la antibiotice este rar întâlnită la *E. rhusiopathiae*, monitorizarea acesteia rămâne importantă. În acest sens, se recomandă efectuarea testelor de sensibilitate pentru fiecare izolat clinic, în vederea stabilirii unui tratament optim.

Testarea sensibilității antimicrobiene se realizează frecvent prin metoda difuziei pe disc (Kirby–Bauer), care permite evaluarea susceptibilității bacteriene prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție formate în jurul discurilor impregnate cu antibiotice.

VIII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL *BACILLUS*

Genul *Bacillus*, încadrat în familia *Bacillaceae*, cuprinde bacili Gram-pozitivi (uneori Gram-variabili), aerobi sau facultativ anaerobi, în general mobili (cu excepția unor specii), capabili de formare de endospori. Aceștia au formă de tijă, cu capete rotunjite sau uneori drepte, și prezintă o rezistență crescută la condițiile de mediu, datorită sporilor.

Sunt cunoscute peste 50 de specii, dintre care *Bacillus anthracis* este agentul etiologic al antraxului și este considerat întotdeauna patogen. Alte specii importante includ *Bacillus cereus*, asociat în principal cu toxiinfecții alimentare și infecții oportuniste (inclusiv infecții nosocomiale și panoftalmită), precum și *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus sphaericus* și *Bacillus stearothermophilus*.

Speciile genului *Bacillus* prezintă o diversitate metabolică considerabilă; unele sunt termofile și se dezvoltă optim la temperaturi de aproximativ 55°C sau mai mari. Supraviețuirea acestora în natură este facilitată de formarea sporilor, care sunt rezistenți la condiții nefavorabile în care formele vegetative nu pot persista. Datorită distribuției lor ubiquitare, izolarea *Bacillus spp.* din probe clinice poate reflecta uneori contaminare.

Din punct de vedere diferențial, speciile de *Bacillus* pot fi confundate cu tulpinile aerotolerante de *Clostridium*. Totuși, *Bacillus spp.* sunt, în general, catalazo-pozitive și formează endospori în condiții aerobe, în timp ce *Clostridium spp.* sunt catalazo-negative și sporulează strict în condiții anaerobe.

Majoritatea speciilor cresc bine pe agar sânge (SBA) și pe alte medii îmbogățite uzuale. Caracteristicile coloniilor variază în funcție de specie și de mediul de cultură, însă, în general, coloniile sunt nepigmentate. Speciile sunt catalazo- pozitive și pot forma endospori atât în condiții aerobe, cât și anaerobe (în funcție de specie).

Pe baza caracteristicilor genetice și morfologice, genul *Bacillus* este împărțit în mai multe grupuri, dintre care cel mai important din punct de vedere medical este grupul *Bacillus cereus*, care include *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* și *Bacillus mycoides*.

1. *Bacillus anthracis* și antraxul

Antraxul este o boală infecțioasă acută determinată de *Bacillus anthracis*, care afectează în principal erbivorele (bovine, ovine, caprine, cabaline), infectate de obicei prin ingestia sporilor din sol sau de pe vegetație contaminată. La om, infecția apare prin contact cu animale infectate sau cu produse de origine animală contaminate (lână, piei, păr), motiv pentru care boala este cunoscută și sub denumirea de „boala sortatorilor de lână” (wool sorter’s disease).

B. anthracis este un bacil Gram-pozitiv, nemotil, sporulat, prezent în sol. Sporii săi pot supraviețui ani de zile în medii uscate, datorită rezistenței ridicate la condiții adverse. După pătrunderea în organism, sporii germinează la nivelul porții de intrare, iar multiplicarea formelor vegetative determină apariția edemului caracteristic și a leziunilor tisulare locale, ca urmare a acțiunii factorilor de virulență.

Transmiterea interumană nu a fost demonstrată.

Infecția la om se poate produce pe trei căi principale:

- cutanată (cea mai frecventă, aproximativ 95% din cazuri);
- respiratorie (prin inhalarea sporilor);

- digestivă (prin ingestia de alimente contaminate).

Stabilitatea deosebită a sporilor determină includerea *Bacillus anthracis* în categoria agenților biologici de risc, datorită dificultății de inactivare în procesele de decontaminare.

Forme clinice ale antraxului

Antraxul cutanat apare prin inocularea sporilor la nivelul tegumentului lezat. După o perioadă de incubație de 2–3 zile, apare o papulă la locul inoculării, care evoluează spre vezicule dispuse periferic. Ulterior, se formează o leziune ulcerativă cu o zonă centrală necrotică neagră, denumită escară. Leziunea este caracteristic nedureroasă și, în absența suprainfecției, nu produce puroi. De obicei, are un diametru de 1–3 cm și se vindecă în 1–2 săptămâni, lăsând o cicatrice. Pot apărea limfangită și limfadenopatie regională; simptomele sistemice sunt, în general, absente în formele necomplicate.

Antraxul respirator (boala lânii) apare prin inhalarea sporilor. Debutul este nespecific, cu febră moderată, stare de rău și fatigabilitate, mimând o infecție respiratorie virală. După 2–3 zile, evoluția devine rapid severă, cu detresă respiratorie, dispnee, cianoză și frecvent revărsat pleural. Pot surveni manifestări neurologice (dezorientare, comă), iar evoluția poate fi fulminantă, cu deces în 24 de ore de la instalarea fazei severe.

Antraxul gastrointestinal apare prin ingestia sporilor și implică mucoasa intestinală lezată. Se manifestă prin dureri abdominale, greață, vărsături, anorexie și uneori diaree hemoragică. Diagnosticul este dificil, iar rata mortalității este mai ridicată comparativ cu forma cutanată.



Figura 11. Coloratie gram-pozitiv *Bacillus anthracis*

Recoltare

Se face în funcție de forma clinică a antraxului, pot fi recoltate diferite tipuri de probe:

- Sânge pentru culturi bacteriene și teste serologice.
- Lichid cefalorahidian (LCR) în cazul meningitei antraxice.
- Lichid de puncție din leziuni cutanate sau abcese.
- Țesuturi în cazul formelor letale de antrax.
- Secreții respiratoria, spută sau aspirat traheal pentru cazurile de antrax pulmonar.
- Fecale în cazurile suspecte de antrax gastrointestinal.
- Probe de mediu din sol, apă, furaje (pentru investigații epidemiologice).

Izolare

Bacillus anthracis se dezvoltă pe medii uzuale de cultură, formând colonii caracteristice, de dimensiuni mari, cu margini neregulate, aderente la suprafața mediului și, în mod tipic, nehemolitice. Aspectul coloniilor a fost clasic descris ca fiind asemănător „capului de meduză”.

Pe agar-sânge (SBA), coloniile sunt mari (2–5 mm), de culoare gri, plate și cu margini neregulate. Ele prezintă o consistență tenace, aderând ferm la suprafața mediului; atunci când sunt ridicate cu ansa bacteriologică, marginile rămân verticale, fără a se prăbuși, conferind un aspect comparat cu cel al albușului de ou bătut. Deși *B. anthracis* este în mod obișnuit nehemolitic pe agar-sânge, poate apărea ocazional o hemoliză discretă sub zonele de creștere abundentă după incubare prelungită. Aceasta nu trebuie confundată cu β -hemoliza, caracteristică altor specii de *Bacillus*, care sunt frecvent hemolitice.

Medii de cultură

Deoarece *B. anthracis* este, în general, izolat din produse patologice sterile (precum sânge, țesut pulmonar sau lichid cefalorahidian), utilizarea mediilor selective nu este, de regulă, necesară. Totuși, în anumite situații, pot fi utilizate medii selective pentru facilitarea izolării:

- **Agar cu alcool feniletic (PEA)** – unele tulpini pot crește, însă dezvoltarea este de obicei slabă;
- **Mediul PLET (Polimixină–Litiu–EDTA–Acetat de taliu)** – utilizat în special pentru probe contaminate (de exemplu, materii fecale), pentru izolarea selectivă a *B. anthracis*;
- În suspiciunea de contaminare a probelor fecale, protocolul recomandă utilizarea agarului PEA în paralel cu agar-sânge și alte medii uzuale.

Identificare

Microscopia directă

Examinarea frotiurilor colorate Gram, realizate din leziuni cutanate, spută sau materii fecale, evidențiază bacili Gram-pozitivi, mari, cu capete tăiate drept, dispuși izolat sau în lanțuri. Sporii apar ca zone centrale necolorate în bacili, fiind evidenți mai ales în preparatele din culturi.

Tehnicile de imunofluorescență, utilizând anticorpi marcați, permit evidențierea antigenelor bacteriene și susțin diagnosticul, însă nu sunt disponibile în mod curent în toate laboratoarele.

Identificarea *B. anthracis* trebuie realizată exclusiv în laboratoare specializate, în condiții stricte de biosecuritate. Diagnosticul se bazează pe corelarea caracterelor culturale, morfotinctoriale și biochimice, inclusiv demonstrarea imobilității și a producerii de lecitinază.

Pentru identificare avansată se pot utiliza sisteme automate, precum **bioMérieux VITEK** sau alte platforme similare.

O metodă de identificare prezumtivă constă în cultivarea pe medii care conțin penicilină (0,05–0,5 U/ml). După 3–6 ore de incubare la 37°C, examinarea microscopică relevă bacili mari dispuși în lanțuri, cu aspect caracteristic de „șirag de perle”.

Sensibilitatea la antibiotice

Majoritatea tulpinilor de *Bacillus anthracis* sunt sensibile la penicilină, aceasta reprezentând tratamentul de elecție în formele sensibile. De asemenea, microorganismul prezintă sensibilitate față de mai multe antibiotice cu spectru larg, inclusiv gentamicină, eritromicină, tetraciclină și cloramfenicol.

IX. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

Familia *Enterobacteriaceae* cuprinde un grup numeros și heterogen de bacterii, incluzând aproximativ 176 de specii distribuite în peste 40 de genuri. Cu toate acestea, în practica clinică curentă, majoritatea izolatelor provenite din unitățile de îngrijire medicală sunt reprezentate de specii precum *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Proteus mirabilis*. Cunoașterea altor membri ai familiei rămâne esențială, deoarece numeroase specii sunt implicate în infecții semnificative, în special la pacienții cu factori de risc.

Din punct de vedere clinic și microbiologic, studiul acestei familii poate fi structurat în trei direcții principale: bacterii enterice oportuniste implicate în infecții, agenți patogeni intestinali primari și bolile asociate acestora, precum și metodele utilizate pentru identificarea acestor microorganisme.

Caracteristici generale

Membrii familiei *Enterobacteriaceae* sunt bacili Gram-negativi, anaerobi facultativi, nesporulați. În preparatele colorate Gram, aceștia pot apărea sub formă de bastonașe drepte sau, uneori, ca forme coccobacilare.

Pe medii de cultură neselective, precum agar-sânge (SBA) sau agar-ciocolată (CHOC), morfologia coloniilor are o valoare limitată pentru identificarea inițială. În general, aceste bacterii formează colonii mari, umede, de culoare gri. Există însă excepții notabile: speciile din genul *Klebsiella* și unele specii de *Enterobacter* pot produce colonii mari, cu aspect mucoid, datorită capsulei polizaharidice. De asemenea, anumite tulpini de *Escherichia coli* pot prezenta β -hemoliză pe agar-sânge.

Medii selective și diferențiale

Pentru izolarea și identificarea prezumtivă a bacteriilor enterice, se utilizează o varietate de medii selective și diferențiale, precum:

- agar cu eozină și albastru de metilen (EMB),
- agar MacConkey (MAC),
- agar Hektoen enteric (HE),
- agar xiloză-lizină-desoxicolat (XLD).

Aceste medii conțin carbohidrați (de obicei lactoză și/sau zaharoză) și indicatori de pH, care permit evidențierea capacității bacteriilor de a fermenta acești compuși. Fermentația carbohidraților determină scăderea pH-ului și modificarea culorii mediului, facilitând diferențierea între bacteriile fermentative și cele nefermentative. Speciile nefermentative nu produc modificări de culoare, iar coloniile păstrează aspectul inițial al mediului.

Anumite medii, precum HE și XLD, permit și evidențierea producției de hidrogen sulfurat (H_2S). Acestea conțin tiosulfat de sodiu și săruri de fier (de exemplu, citrat feric), care reacționează cu H_2S , ducând la formarea unor precipitate negre caracteristice în coloniile bacteriene.

Aceste proprietăți au fost utilizate tradițional pentru diferențierea și caracterizarea genurilor bacteriene. Totuși, identificarea definitivă necesită corelarea acestor rezultate cu teste biochimice suplimentare și, în anumite cazuri, cu determinări serologice bazate pe structuri antigenice specifice.

Clasificare

Membrii familiei *Enterobacteriaceae* sunt clasificați pe baza caracteristicilor biochimice și genetice. În mod tradițional, clasificarea a fost realizată prin gruparea bacteriilor cu proprietăți biochimice similare (conform sistemului propus de Ewing), urmată de delimitarea în genuri și specii.

În prezent, identificarea și clasificarea se bazează pe o combinație de criterii:

- profil biochimic;
- structuri antigenice (în special pentru anumite specii, precum *Salmonella*);
- analiza moleculară, inclusiv omologia ADN și tehnici moderne de biologie moleculară.

Această abordare integrată permite o identificare mai precisă și o înțelegere mai profundă a relațiilor filogenetice dintre membrii familiei *Enterobacteriaceae*.

Tabelul 6. Familia *Enterobacteriaceae*

Familia	Gen	Specii / Subspecii
Escherichieae	Escherichia	coli, albertii, blattae, vulneris, fergusonii, hermanii
	Shigella	-
Edwardsiellae	Edwardsiella	dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei
Salmonelleae	Salmonella	enterica, bongori
Citrobacteriaceae	Citrobacter	-
Klebsielleae	Klebsiella	pneumoniae subsp. pneumoniae, pneumoniae subsp. ozaenae, pneumoniae subsp. rhinoscleromatis, varicola, ornitholytica
Proteeae	Proteus	mirabilis, vulgaris, penneri, hauseri, myxofaciens
	Morganella	morganii
	Providencia	alcalifaciens, rettgeri, stuartii
Yersinieae	Yersinia	pseudotuberculosis, pestis, enterocolitica, frederiksenii, kristensenii, intermedia, ruckeri

Mediile de cultură

Majoritatea *Enterobacteriaceae* cresc bine pe medii de laborator standard, cum ar fi sânge de oaie 5%, ciocolată și agar MacConkey. În plus față de aceste medii, agar-urile selective, cum ar fi agarul Hektoen enteric (HE), agarul xiloză-lizină-deoxicolat (XLD) și agarul *Salmonella-Shigella* (SS) sunt utilizate în mod obișnuit pentru cultivarea agenților patogeni enterici din probe gastrointestinale. Bulionii utilizați în sistemele de hemocultură, precum și bulionii de tioglicolat și Bulionul de infuzie inimă-creier (Brain Heart Infusion – BHI), favorizează creșterea *Enterobacteriaceae*.

Agarul Cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN) este un mediu selectiv utilizat în mod specific pentru izolarea *Y. enterocolitica* din probe gastrointestinale. În mod similar, agarul MacConkey-sorbitol este utilizat pentru a diferenția *E. coli* sorbitol-negativ, de alte tipuri de *E. coli* care sunt capabile să fermenteze acest alcool zaharat. *Klebsiella granulomatis* nu crește pe medii agar obișnuite. Recent, organismul a fost cultivat în monocite umane prelevate din biopsii de ulcere genitale ale pacienților cu donovanoză. Din punct de vedere istoric, microorganismul a fost cultivat, de asemenea, pe un mediu special, care conține factori de creștere găsiți în gălbenușul de ou.

1. *Escherichia coli*

Este o bacterie Gram-negativă, non-sporulantă, în formă de bastonaș, anaerobă facultativă și coliformă, aparținând genului *Escherichia*, familia *Enterobacteriaceae*, care trăiește în mod obișnuit în mediul înconjurător, în alimente și în intestinul inferior al animalelor. Aceasta poate trăi perioade lungi de timp în fecale, sol și apă și este frecvent utilizată ca organism indicator al contaminării apei. Timp de 2-3 zile, bacteria se înmulțește rapid în fecalele proaspete în condiții aerobe.

Este mobilă datorită aranjamentului flagelar peritrichous, iar foarte puține tulpini sunt nemotile. Creșterea optimă a *E. coli* are loc la 37°C, dar unele tulpini de laborator se pot multiplica la temperaturi de până la 49°C.



Figura 12. Colorație gram *Escherichia coli*.

Caracteristici generale și importanță clinică

Escherichia coli reprezintă o specie bacteriană extrem de heterogenă, incluzând tulpini care variază de la organisme comensale inofensive până la variante cu potențial patogen ridicat. Aceasta colonizează tractul gastrointestinal al nou-născutului la scurt timp după naștere și contribuie la menținerea homeostaziei intestinale. De asemenea, anumite tulpini sunt utilizate ca probiotice, având efecte benefice asupra sănătății gazdei.

Din punct de vedere metabolic, *E. coli* este un bacil Gram-negativ, chemoorganotrof, anaerob facultativ, capabil atât de metabolism respirator, cât și fermentativ. Bacteria circulă între două habitate principale: intestinul animalelor și mediul extern (apă, sol, sedimente), stabilind o relație mutualistă cu gazda. Astfel, *E. coli* sintetizează vitamine esențiale, precum vitamina K și unele vitamine din complexul B, contribuind la protecția împotriva colonizării cu microorganisme patogene, în timp ce gazda îi oferă nutrienți și un mediu favorabil.

Deși majoritatea tulpinilor sunt nepatogene, unele serotipuri pot produce afecțiuni variate, incluzând infecții urinare, diaree, bacteriemie, sepsis neonatal, meningită, precum și infecții respiratorii sau renale.

Manifestări clinice

Escherichia coli este recunoscută drept cea mai frecventă cauză de infecții de tract urinar (ITU) necomplicate dobândite în comunitate și reprezintă, de asemenea, un agent important în infecțiile nosocomiale. Tulpinile implicate în aceste infecții provin, de regulă, din flora intestinală proprie a gazdei. Există diferențe între tulpinile care determină infecții la gazde imunocompetente și cele implicate în infecții la pacienți cu factori predispozanți (anomalii ale tractului urinar, cateterizare etc.).

Tulpinile uropatogene responsabile de pielonefrita acută la indivizi sănătoși aparțin unor serotipuri specifice și prezintă rezistență la acțiunea bactericidă a serului uman.

În sfera gastrointestinală, *E. coli* poate determina multiple sindroame diareice. Clasificarea tulpinilor patogene se bazează pe factorii de virulență, tabloul clinic, epidemiologie și antigenele somatice (O) și flagelare (H). Se disting șase categorii majore de *E. coli* diareică (enterovirulentă):

1. **E. coli enterotoxigenă (ETEC)** – determină diaree apoasă, frecvent asociată cu consumul de apă sau alimente contaminate; este principala cauză a diareei călătorului.
2. **E. coli enteropatogenă (EPEC)** – produce diaree apoasă, în special la sugari și copii mici, în condiții de igienă precară.
3. **E. coli enteroagregativă (EAEC)** – determină diaree persistentă sau acută, de obicei fără febră sau vărsături; poate fi implicată și în diareea călătorului.
4. **E. coli enteroinvazivă (EIEC)** – prezintă similarități cu *Shigella*; produce diaree inflamatorie cu mucus și sânge, febră și crampe abdominale, fiind asociată cu consumul de alimente contaminate.
5. **E. coli aderentă difuz (DAEC)** – afectează în special copiii de vârstă mică, determinând episoade de diaree și vărsături.
6. **E. coli enterohemoragică (EHEC/STEC)** – produce toxine Shiga care afectează mucoasa intestinală, determinând diaree hemoragică. Tulpina O157:H7 este cea mai cunoscută și poate provoca sindrom hemolitic uremic, în special la copii, caracterizat prin insuficiență renală acută și complicații severe sistemice.

Infecții sistemice

E. coli este implicată frecvent în bacteriemii, în special în context nosocomial, sursele principale fiind tractul urogenital, gastrointestinal și respirator, precum și dispozitivele medicale invazive (catetere, linii intravenoase, tuburi endotraheale). Manifestările severe sunt asociate cu reacția sistemică la lipopolizaharid (LPS), componentă a membranei externe, responsabilă de endotoxemie și șoc septic.

În perioada neonatală, *E. coli* reprezintă o cauză importantă de meningită și septicemie, în special la prematuri.

Recoltarea probelor

Tipul probelor biologice recoltate depinde de localizarea infecției suspectate:

- materii fecale – pentru infecții intestinale;
- urină – în infecțiile de tract urinar;
- sânge – pentru hemoculturi în infecții sistemice;
- lichid cefalorahidian – în meningite;
- alte probe (spută, secreții purulente) – în funcție de contextul clinic.

Izolare și identificare

Pe medii selective și diferențiale, precum agar MacConkey (MAC) și agar EMB, *E. coli* prezintă caractere culturale distinctive:

- pe agar MacConkey – colonii lactoză-pozitive, de culoare roz, adesea înconjurată de precipitat de săruri biliare;
- pe agar EMB – colonii cu luciu metalic verde caracteristic.

Din punct de vedere biochimic, *E. coli* prezintă următoarele caracteristici:

- fermentează glucoza, lactoza, trehaloza și xiloza;
- produce indol din triptofan;

- este metil roșu pozitivă și Voges–Proskauer negativă (calea mixtă a acizilor);
- nu produce hidrogen sulfurat (H₂S), DN-ază, urează sau fenilalanin-deaminază;
- nu utilizează citratul ca sursă unică de carbon.

Aceste proprietăți, corelate cu testele serologice și metodele moleculare, permit identificarea precisă a speciei și diferențierea tulpinilor patogene.

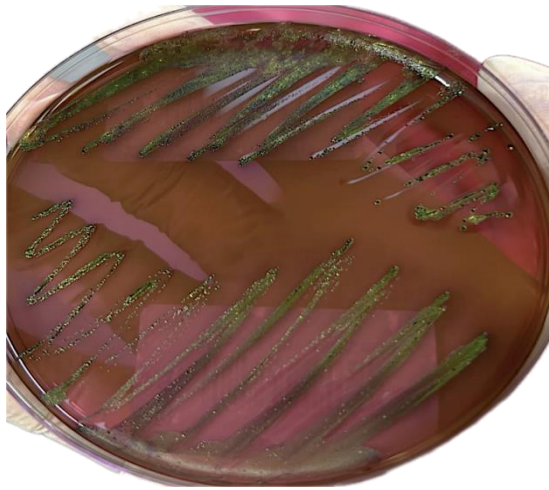


Figura 13 Identificare *Escherichia coli* – mediul EMB.

Identificare

Escherichia coli – caractere culturale și biochimice

Escherichia coli se dezvoltă, în mod obișnuit, sub formă de colonii netede, translucide sau ușor opace pe medii neselective, iar pe agar-sânge poate prezenta uneori hemoliză. Majoritatea tulpinilor sunt lactoză- pozitive, ceea ce determină apariția colorației galbene pe mediul CLED, ca urmare a producerii de acid și gaz în interval de 24–48 de ore. Totuși, există și tulpini non-fermentatoare de lactoză. Tulpinile implicate în infecțiile extraintestinale sunt frecvent capsulate, capsula polizaharidică reprezentând un important factor de virulență.

Din punct de vedere biochimic, *E. coli* este caracterizată prin:

- producerea de indol din triptofan;
- activitate pozitivă pentru decarboxilaza lizinei și ornitinei;
- test metil roșu pozitiv;
- test Voges–Proskauer negativ;
- absența producerii de urează, H₂S, DN-ază și fenilalanin-deaminază;
- incapacitatea de a utiliza citratul ca sursă unică de carbon.

Tulpina enterohemoragică *E. coli* O157:H7 se caracterizează prin incapacitatea de a fermenta sorbitolul, apărând sub formă de colonii incolore pe mediul sorbitol MacConkey (CT-SMAC). Totuși, alte tulpini pot fermenta sorbitolul, motiv pentru care suspiciunea clinică (de exemplu, în sindromul hemolitic uremic) trebuie corelată cu investigațiile de laborator.

Examinarea directă și teste de screening

Pentru evaluarea infecțiilor, în special urinare, se utilizează:

- examenul microscopic în montaj umed, pentru evidențierea piuriei;
- testul esterazei leucocitare;
- testul reducerii nitraților (testul Griess);
- testul catalazei.

2. Genul *Salmonella*

Genul Salmonella, aparținând familiei *Enterobacteriaceae*, include bacili Gram-negativi, facultativ anaerobi, cu importanță majoră în patologia umană și veterinară. Clasificarea actuală recunoaște două specii principale: *Salmonella enterica* și *Salmonella bongori*. Specia *S. enterica* este subdivizată în mai multe subspecii, dintre care subspecia enterica cuprinde majoritatea serotipurilor patogene pentru om (de exemplu, serotipurile *Typhi* și *Typhimurium*).

Numeroase serotipuri de *Salmonella* sunt întâlnite la animale (în special păsări, reptile și rozătoare), care constituie rezervoare naturale de infecție. Serotipurile *Salmonella Typhi* și *Salmonella Paratyphi* sunt strict adaptate gazdei umane și sunt responsabile de febra enterică (tifoidă și paratifoidă). Alte serotipuri (*Salmonella* non-tifoidă – NTS) sunt larg răspândite și determină, în principal, gastroenterite, dar pot provoca și infecții sistemice.

Manifestări clinice

Infecțiile cu *Salmonella* pot evolua sub diverse forme:

- **gastroenterită acută (toxiinfecție alimentară)** – caracterizată prin debut rapid (6–48 ore), cu greață, vărsături, diaree, dureri abdominale, febră (38–39°C), cefalee și mialgii; durata este de obicei 2–7 zile;
- **febra enterică (tifoidă/paratifoidă)** – infecție sistemică severă, cu perioadă de incubație de 10–14 zile, manifestată prin febră prelungită, anorexie, cefalee, mialgii și tulburări digestive; netratată, poate avea evoluție fatală;
- **bacteriemie și infecții localizate;**
- **starea de purtător cronic**, în special prin colonizarea vezicii biliare.

Transmiterea se realizează pe cale fecal-orală, prin consum de alimente sau apă contaminate (carne de pasăre, ouă, lapte nepasteurizat), precum și prin igienă deficitară.

Recoltarea probelor

Diagnosticul se bazează pe izolarea bacteriei din:

- materii fecale (în gastroenterite);
- sânge (în febra enterică);
- alte produse patologice, în funcție de localizare.

Izolare și medii de cultură

Izolarea implică însămânțarea probelor pe medii selective și diferențiale:

- agar MacConkey, EMB;
- agar Hektoen enteric (HE);
- agar xiloză-lizină-deoxicolat (XLD);
- agar Salmonella–Shigella;
- agar verde strălucitor;
- agar sulfit de bismut.

Se utilizează, de asemenea, medii de îmbogățire (bulion selenit F, bulion tetratonat), urmate de subcultivare pe medii solide.

Coloniile suspecte sunt evaluate biochimic pe medii precum agar triplu zahăr-fier (TSI) și agar lizină-fier (LIA), iar identificarea este confirmată serologic prin determinarea antigenelor O (somatice) și H (flagelare).

Identificare

Salmonella formează colonii incolore pe medii care conțin lactoză (nefermentatoare). Pe medii precum HE sau XLD, producerea de H₂S determină apariția unui centru negru în colonii.

Caracteristici biochimice:

- nefermentatoare de lactoză (în majoritatea cazurilor);
- indol negativ;
- Voges–Proskauer negativ;
- urează negativă;
- fenilalanin-deaminază negativă;
- majoritatea produc H₂S (excepție: S. Paratyphi A);
- nu cresc în prezența cianurii de potasiu.

Identificarea se realizează prin teste biochimice (de tip API 20E), metode moderne (MALDI-TOF) și confirmare serologică.

Sensibilitatea la antibiotice

În febra tifoidă, tratamentul de primă linie include **ceftriaxona**. În funcție de rezultatele antibiogrammei, pot fi utilizate:

- ciprofloxacina,
- azitromicina,
- ampicilina,
- cotrimoxazolul.

În gastroenteritele necomplicate, tratamentul antibiotic nu este, de obicei, necesar, fiind rezervat cazurilor severe sau pacienților cu risc (imunodeprimați, nou-născuți, vârstnici). În infecțiile invazive, alegerea antibioticelor se bazează pe sensibilitatea in vitro.

Ceftriaxona prezintă o bună penetrare în lichidul cefalorahidian și este utilizată în meningitele determinate de *Salmonella*.

3. Genul *Shigella* – caracteristici generale și importanță clinică

Genul *Shigella* cuprinde patru specii principale: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* și *Shigella sonnei*. Aceste microorganisme sunt agenți etiologici ai dizenteriei bacilare, o formă de diaree invazivă, cu mecanism patogenetic similar celui întâlnit la *Escherichia coli* enteroinvazivă (EIEC). Din punct de vedere filogenetic, *Shigella* este strâns înrudită cu *Escherichia coli*, studiile de hibridizare ADN demonstrând o relație genetică foarte apropiată, uneori considerată la nivel de specie.

Caracteristici microbiologice

Speciile de *Shigella* sunt bacili Gram-negativi, nesporulați, imobili și anaerobi facultativi.

Din punct de vedere antigenic:

- *S. dysenteriae* include aproximativ 10 serotipuri;
- *S. boydii* – aproximativ 15 serotipuri;
- *S. flexneri* – mai multe serotipuri și subtipuri, definite prin antigene de grup și tip;
- *S. sonnei* prezintă un număr mai redus de variații antigenice.

Epidemiologie și transmitere

Shigeloză sau dizenteria bacilară afectează predominant copiii mici, însă poate apărea la orice vârstă, în special în contextul călătoriilor în regiuni cu igienă deficitară. Transmiterea este facilă, realizându-se pe cale fecal-orală, direct sau indirect, prin alimente, apă sau obiecte contaminate. Muștele pot acționa ca vectori mecanici. Sursa principală de infecție este reprezentată de persoanele bolnave sau purtătorii (inclusiv convalescenți sau asimptomatici).

Patogeneză

Infecția este inițiată prin ingestia bacteriei, urmată de traversarea intestinului subțire și invazia epitelului colonic. *Shigella* determină distrucția mucoasei intestinale, producând ulcerații și un răspuns inflamator intens. Procesul este amplificat de eliberarea locală de citokine și infiltrarea leucocitară.

Bacteria rămâne, în general, limitată la mucoasa intestinală, fără diseminare sistemică semnificativă. Produce mai multe toxine, dintre care cea mai importantă este **toxina Shiga** (în special la *S. dysenteriae* tip 1), cu efecte citotoxice, enterotoxice și neurotoxice.

Manifestări clinice

Perioada de incubație variază între 1 și 7 zile, cel mai frecvent între 12 și 50 de ore. Debutul este caracterizat prin:

- febră;
- stare generală alterată;
- anorexie.

Ulterior apare diareea, inițial apoasă, însoțită de crampe abdominale și tenesme, care poate evolua spre dizenterie, caracterizată prin scaune frecvente, de volum redus, conținând sânge, mucus și celule inflamatorii.

Alte manifestări includ:

- dureri abdominale;
- sensibilitate abdominală;
- vărsături;
- deshidratare;
- convulsii (mai ales la copii).

În majoritatea cazurilor, boala este autolimitată, însă antibioterapia poate reduce durata simptomelor și excreția bacteriană. Fluorochinolonele sunt frecvent utilizate ca tratament empiric, în funcție de profilul de sensibilitate.

Dizenteria bacilară se diferențiază de alte forme de diaree (de exemplu, holera sau diareea enterotoxigenică) prin prezența scaunelor cu sânge și mucus, de volum redus, asociate cu inflamație intensă a mucoasei rectosigmoidiene. Boala are un impact major în țările în curs de dezvoltare, contribuind semnificativ la morbiditate și întârzierea creșterii la copii.

Recoltarea probelor

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea bacteriei din materii fecale:

- probele fecale se colectează în recipiente sterile și se transportă rapid la laborator;
- dacă transportul depășește 2 ore, probele se păstrează la 4°C (până la 24 de ore);
- tamponanele rectale se introduc în medii de transport (de exemplu, mediu Stuart modificat).

Izolare și diagnostic

Pentru izolarea optimă se utilizează medii selective și diferențiale:

- medii cu selectivitate redusă: agar MacConkey (MAC);
- medii selective: agar xiloză-lizină-deoxicolat (XLD), agar Hektoen enteric (HE);
- agar *Salmonella–Shigella* (SS), utilizat cu precauție deoarece poate inhiba unele tulpini de *S. dysenteriae*.

Nu există un mediu de îmbogățire ideal pentru toate speciile de *Shigella*, însă se pot utiliza bulionul gram-negativ (GN) sau bulionul selenit.

Identificarea se bazează pe:

- caracteristici culturale și biochimice;
- teste serologice (antigene O);
- metode moderne (ex. MALDI-TOF).

Examinarea microscopică a frotiului fecal colorat (de exemplu, cu albastru de metilen) poate evidenția leucocite, sugerând o colită inflamatorie, însă acest test nu este specific pentru *Shigella*.

4. Genul *Klebsiella*

Genul *Klebsiella* include bacili Gram-negativi, **încapsulați, nemotili, oxidazo-negativi** și anaerobi facultativi, aparținând familiei *Enterobacteriaceae*. Denumirea genului a fost introdusă de Trevisan în onoarea bacteriologului german **Edwin Klebs**.

În prezent, genul cuprinde numeroase specii, dintre care cele mai relevante clinic aparțin **complexului *Klebsiella pneumoniae*** (incluzând *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*), dar și alte specii precum *K. oxytoca*, *K. michiganensis* sau *K. grimontii*.

Aceste bacterii colonizează în mod obișnuit tractul gastrointestinal al omului și animalelor. Lipsa motilității reprezintă un criteriu important de diferențiere față de majoritatea altor membri ai familiei *Enterobacteriaceae*.

Importanță clinică

Klebsiella pneumoniae este cea mai importantă specie din punct de vedere medical, fiind implicată în:

- infecții nosocomiale și comunitare;
- pneumonii (în special la pacienți spitalizați sau imunocompromiși);
- infecții urinare;
- infecții intraabdominale;
- infecții ale plăgilor și bacteriemii.

Speciile pot fi transmise interuman, în special în mediul spitalicesc.

Subspeciile:

- *K. pneumoniae* subsp. ***rhinoscleromatis*** → determină rinosclerom (infecție granulomatoasă cronică a tractului respirator superior);
- *K. pneumoniae* subsp. ***ozaenae*** → asociată cu rinita atrofică cronică.

Caracteristici de laborator

Pe agar MacConkey, *Klebsiella* formează:

- colonii **lactoză-pozitive (roz)**;
- aspect **mucoïd pronunțat**, datorat capsulei polizaharidice (factor major de virulență, cu rol antifagocitar).

5. Genul *Proteus*

Genul *Proteus* include mai multe specii, dintre care cele mai importante clinic sunt:

- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*

Aceste bacterii sunt bacili Gram-negativi, mobili, caracterizate prin fenomenul de „**swarming**” (expansiune concentrică pe medii solide).

Importanță clinică

Proteus spp. sunt implicați în:

- infecții urinare (în special complicate, asociate cateterelor);
- infecții de plagă;
- bacteriemii (mai rar);
- alte infecții (pneumonie, abcese, meningită neonatală – rar).

Un element esențial de patogeneză este **producția de urează**, care:

- hidrolizează ureea → amoniac;
- alcalinizează urina;
- favorizează formarea calculilor de tip **struvită** și biofilmelor pe catetere.

Caracteristici de laborator

- colonii cu fenomen de „swarming” pe agar-sânge;
- miros caracteristic;
- produc urează și frecvent H₂S;

- diferențiere:
 - *P. mirabilis* → indol negativ, ornitină pozitivă
 - *P. vulgaris* → indol pozitiv, ornitină negativă
- Majoritatea tulpinilor sunt lactoză-negative.

6. Genurile *Providencia* și *Morganella*

Providencia

Genul *Providencia* include mai multe specii, dintre care cele mai relevante sunt:

- *Providencia stuartii*
- *Providencia rettgeri*
- *Providencia alcalifaciens*

Aceste bacterii sunt bacili Gram-negativi, lactoză-negativi, care produc **fenilalanin-deaminază**.

Importanță clinică

- *P. stuartii* → frecvent implicată în ITU la pacienți cu cateter;
- *P. rettgeri* → infecții urinare nosocomiale, infecții de plagă;
- *P. alcalifaciens* → enterite acute (diaree, dureri abdominale).

Identificarea se realizează prin metode biochimice sau moderne (ex. MALDI-TOF).

Morganella

Specia principală este *Morganella morganii*, bacil Gram-negativ, mobil, lactoză-negativ.

Caracteristici:

- produce urează și fenilalanin-deaminază;
- nu produce H₂S (spre deosebire de unele *Proteus*);
- nu prezintă fenomen de swarming.

Importanță clinică

Infecțiile includ:

- infecții urinare (cele mai frecvente);
- infecții ale pielii și țesuturilor moi;
- infecții hepatobiliare;
- bacteriemii (rar).

Apar frecvent la pacienți vârstnici sau cu dispozitive medicale (catetere).

7. Genul *Yersinia*

Genul *Yersinia* include bacili Gram-negativi, coccobacilari, anaerobi facultativi. Unele specii sunt mobile la temperaturi de ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), dar devin nemobile la 37°C .

Dintre cele aproximativ 14 specii, trei sunt patogene pentru om:

- *Yersinia pestis*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Yersinia pseudotuberculosis*

Yersinia pestis – agentul ciumei

Este agentul etiologic al ciumei, o boală zoonotică gravă, transmisă în principal prin **înțepătura puricilor infectați** de la rozătoare.

Forme clinice:

- **bubonică** (cea mai frecventă) → adenopatii dureroase („buboane”);
- **septicemică**;
- **pneumonică** (poate fi și formă primară prin inhalare).

Caracteristici microbiologice

- bacil Gram-negativ cu **colorație bipolară** („aspect de ac de siguranță”) la colorația Wayson sau albastru de metilen;
- poate fi cultivat pe medii uzuale, dar necesită condiții de biosecuritate.

Yersinia enterocolitica și *Y. pseudotuberculosis*

Aceste specii determină:

- enterocolite;
- limfadenită mezenterică (poate mima apendicita);
- infecții sistemice la imunocompromiși.

Transmiterea se face prin:

- alimente contaminate (în special carne de porc insuficient preparată);
- apă sau produse contaminate.

Tabelul 7. Caracteristici ale principalelor forme de ciumă

	Forma bubonică	Forma septicemică	Forma pneumonică
Transmitere	mușcăături de purici de șobolani	- infecție primară - complicație a bolii bubonice sau a bolii pneumonice	- răspândire de la o persoană la o persoană în condiții de aglomerație, condiții neigienice sau în timpul epidemiilor - complicație a ciumei bubonice sau septicemice
Recoltare	lichid din bubițe	celule sanguine albe (blood films)	spută
Simptome	febră, bubițe dureroase, limfadenopatie inghinală	febră, hipotensiune arterială, fără bubițe	tuse sau hemoptizie ± bubițe
Incubație	2-8 zile	2-8 zile	1-4 zile, maxim 6 zile

Caractere de cultură și proprietăți generale

Speciile din genul *Yersinia* sunt coccobacili Gram-negativi de dimensiuni mici, care pot apărea izolați, în perechi sau, mai rar, în lanțuri scurte, în special în culturi lichide. În culturile vechi, microorganismele pot prezenta un pleomorfism accentuat, cu aspect morfologic asemănător celulelor de drojdie.

Sunt bacterii nesporulate, nemotile la 37°C (deși unele specii sunt mobile la temperaturi mai scăzute) și frecvent capsulate, în special în cazul *Yersinia pestis* la temperatura corpului uman.

Yersinia spp. prezintă o gamă largă de temperatură de creștere (aproximativ 14–37°C), cu un optim situat în jurul valorii de 25–28°C. Pe agar-sânge, după 24 de ore de incubare, formează colonii mici, nehemolitice. Din punct de vedere biochimic, sunt catalază-pozitive și oxidază-negative.

Yersinia pestis poate crește pe medii uzuale, inclusiv agar MacConkey, unde dezvoltarea este lentă și coloniile sunt incolore (lactoză-negative). După 48–72 de ore, culturile pot prezenta tendință la autoliză. Din punct de vedere biochimic, *Y. pestis* este negativă pentru citrat, indol și urează. Izolarea se poate realiza din aspirat bubonic, dar și din sânge, lichid cefalorahidian sau spută, în funcție de forma clinică.

Agarul **Cefsulodin–Irgasan–Novobiocin (CIN)** este un mediu selectiv utilizat pentru izolarea *Yersinia spp.* (în special *Y. enterocolitica*), coloniile prezentând aspect caracteristic de tip „ochi de taur” (centru roșu cu periferie translucidă).

Metodele rapide de diagnostic includ imunofluorescența directă. Testele serologice (de exemplu, fixarea complementului sau hemaglutinarea pasivă) pot detecta anticorpi împotriva antigenului capsular F1, specific *Y. pestis*.

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica este un bacil Gram-negativ, responsabil de yersinioză, o boală zoonotică cu manifestări predominant gastrointestinale.

Aceasta se poate prezenta sub forme variate:

- enterită acută;
- adenită mezenterică;
- ileită terminală;
- pseudoapendicită;
- rar, septicemie.

Infecția poate fi însoțită de complicații postinfecțioase, precum artrită reactivă sau eritem nodos.

Manifestări clinice și epidemiologie

Enterita acută este forma cea mai frecventă și se caracterizează prin febră, cefalee, dureri abdominale, greață și diaree, uneori cu sânge. Aceasta afectează în special sugarii și copiii mici (1–5 ani) și are, de regulă, evoluție autolimitată.

Infecțiile sistemice sunt mai frecvente la adulții cu afecțiuni predispozante, precum ciroză hepatică, diabet zaharat, infecția HIV sau boli hematologice.

Transmiterea se realizează în principal pe cale fecal-orală, prin consumul de alimente contaminate (în special carne de porc insuficient preparată), dar și prin apă sau produse contaminate. Transmiterea prin transfuzie de sânge este rară, dar posibilă. Bacteria are rezervoare animale importante, inclusiv porci, câini și pisici.

O caracteristică importantă este excreția prelungită a bacteriei în fecale, care poate persista până la câteva luni după remiterea simptomelor.

Caracteristici de laborator

Y. enterocolitica apare ca coccobacili Gram-negativi cu colorare bipolară. Se dezvoltă pe medii uzuale (agar-sânge, MacConkey), având temperatură optimă de creștere între 25–30°C. Prezintă motilitate la temperaturi joase ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), dar nu la 37°C.

Izolarea poate fi facilitată prin **îmbogățire la rece**, metodă care constă în incubarea probelor fecale la 4°C timp de 1–3 săptămâni, cu subcultivări periodice pe medii selective.

Agarul CIN conține agenți inhibitori (cefsulodin, irgasan, novobiocin, săruri biliare și cristal violet) și permite izolarea selectivă. Fermentarea manitolului determină apariția coloniilor cu centru roșu (datorită scăderii pH-ului și indicatorului roșu neutru), în timp ce coloniile nefermentatoare rămân incolore.

Sensibilitate la antibiotice

Y. enterocolitica este, în general, sensibilă la numeroase antibiotice, dar prezintă rezistență intrinsecă la unele β -lactamine (penicilină, ampicilină, cefalosporine de primă generație), datorită producției de β -lactamaze. În ultimele decenii, s-a observat creșterea frecvenței tulpinilor multirezistente, în special în contextul utilizării excesive a antibioticelor în sectorul alimentar.

Yersinia pseudotuberculosis

Yersinia pseudotuberculosis este o specie strâns înrudită cu *Y. pestis*, având ca rezervor principal animalele (rozătoare, păsări și alte mamifere). Infecția umană este dobândită, în principal, prin ingestia de alimente sau apă contaminate.

Manifestări clinice

Infecția determină:

- limfadenită mezenterică (care poate mima apendicita);
- enterocolită;
- rareori, infecții sistemice (septicemie).

Tabloul clinic poate varia de la forme asimptomatice la infecții severe, asemănătoare febrei tifoide, cu febră, hepatosplenomegalie și manifestări sistemice. Adenita mezenterică este frecvent întâlnită la copii și adolescenți.

Caracteristici microbiologice

Specia poate fi diferențiată de *Y. pestis* prin:

- motilitate la temperaturi scăzute (18–22°C);
- producerea de urează;
- capacitatea de a fermenta ramnoza.

Tulpinile sunt clasificate pe baza antigenelor somatice și flagelare, serotipul 1 fiind cel mai frecvent implicat în infecțiile umane.

Tratament

Infecțiile sunt, în general, autolimitate. În cazurile severe, antibioticele eficiente includ fluorochinolonele, dar și alte clase (de exemplu, ceftriaxonă, doxiciclină, gentamicină), în funcție de sensibilitatea bacteriană.

Speciile patogene ale genului *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) prezintă caracteristici microbiologice distincte și determină un spectru variat de infecții, de la enterite autolimitate până la boli sistemice severe. Diagnosticul corect implică utilizarea unor metode microbiologice adecvate, inclusiv medii selective și tehnici moderne de identificare, iar managementul terapeutic trebuie adaptat profilului de sensibilitate al tulpinilor implicate.

X. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL *VIBRIO*

Genul *Vibrio* aparține familiei *Vibrionaceae* și include peste 110 specii descrise până în prezent, dintre care aproximativ 10 sunt recunoscute ca fiind patogene pentru om.

Speciile de *Vibrio* sunt larg răspândite în mediile acvatice, incluzând apa dulce, apele cu salinitate redusă și mediile marine. Distribuția lor este influențată de temperatură, astfel încât, în regiunile temperate, unde temperatura apei depășește 20°C, în special în lunile de vară, aceste microorganisme pot fi izolate frecvent din apă, alge, plancton, pești și crustacee. În sezonul rece, densitatea lor scade semnificativ, fiind identificate predominant la nivelul sedimentelor.

Riscul de infecție cu *Vibrio spp.* poate fi redus prin evitarea consumului de fructe de mare crude sau insuficient preparate termic, în special în perioadele calde. Această recomandare este deosebit de importantă pentru persoanele imunocompromise sau pentru cele cu afecțiuni hepatice severe. De asemenea, persoanele cu imunosupresie trebuie să evite expunerea leziunilor cutanate la apă dulce sau marină.

Recoltare

Infecțiile cu *Vibrio spp.* nu necesită, în general, proceduri speciale complexe pentru recoltare. Pot fi prelevate diverse tipuri de probe, inclusiv fluide biologice, puroi sau fragmente tisulare. Tamponurile sunt acceptabile dacă sunt transportate în medii adecvate, precum Cary-Blair, pentru a preveni deshidratarea. De asemenea, benzile de hârtie absorbantă impregnate cu materii fecale lichide și păstrate în recipiente etanșe pot menține viabilitatea

microorganismelor pentru perioade îndelungate. Probele de scaun trebuie recoltate precoce în cursul bolii, preferabil înainte de inițierea tratamentului antimicrobian.

Izolare

Speciile de *Vibrio* pot fi izolate dintr-o varietate de probe clinice și sunt implicate într-un spectru larg de afecțiuni, de la gastroenterite ușoare până la holeră, precum și infecții ale plăgilor, septicemii sau fasciite necrozante. Cele mai frecvent identificate specii în laboratorul clinic sunt *Vibrio cholerae* (serogrupurile O1 și non-O1), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* și *V. alginolyticus*.

În afara zonelor costiere, izolarea acestor bacterii este relativ rară, iar suspiciunea clinică se bazează frecvent pe factori epidemiologici, precum consumul recent de fructe de mare crude (în special stridii), călătoriile recente în regiuni endemice, prezența unei diarei de tip holeriform sau antecedente de traumatisme în medii acvatice.

Identificare – Microscopie și cultură

Speciile de *Vibrio* sunt bacili Gram-negativi, asporogeni, de dimensiuni mici ($0,5\text{--}0,8\ \mu\text{m} \times 1,4\text{--}2,6\ \mu\text{m}$), prevăzuți cu flagel polar, care le conferă motilitate. În mediile lichide pot prezenta flagel polar învelit, iar pe medii solide pot dezvolta flageli peritrichi neînveliți. Morfologia tipică este cea de bacili curbați („în formă de virgulă”), deși această caracteristică este uneori evidentă doar în colorațiile Gram inițiale. În anumite condiții de creștere, pot apărea forme pleomorfe sau bastonașe scurte, aparent drepte.

Pe medii uzuale, precum agar nutritiv sau agar-sânge, concentrația de sare (~0,5%) este suficientă pentru creșterea majorității speciilor. Coloniile sunt de dimensiuni medii sau mari, netede, opace, uneori irizante, cu o tentă

verzuie. Pe agar MacConkey, majoritatea speciilor patogene sunt nefermentatoare de lactoză.

Determinarea activității oxidazice este esențială pentru identificare, deoarece *Vibrio spp.* sunt oxidazo-pozitive. Testul trebuie efectuat pe colonii crescute pe medii neselective, pentru a evita reacțiile fals pozitive.

În situațiile în care suspiciunea clinică este justificată, se utilizează agarul TCBS (tiosulfat–citrat–săruri biliare–zaharoză), care diferențiază speciile fermentatoare de zaharoză (colonii galbene, de exemplu *V. cholerae*) de cele nefermentatoare (colonii verzi, de exemplu *V. parahaemolyticus*).

Vibrio cholerae

Holera este o boală diareică acută transmisă în principal prin apă contaminată, dar și prin alimente manipulate sau conservate necorespunzător. Clinic, se caracterizează prin diaree severă de tip „apă de orez”, vărsături și deshidratare rapidă, care poate evolua spre șoc hipovolemic, acidoză metabolică și deces în absența tratamentului.

Serogrupul O1 este responsabil de formele epidemice, iar tulpinile non-O1 determină, în general, forme mai ușoare de boală, deși pot apărea și manifestări severe. Diagnosticul se bazează pe cultura bacteriană sau pe examinarea microscopică în câmp întunecat a scaunului.

V. cholerae este oxidazo-pozitiv, fermentează glucoza și zaharoza, dar nu lactoza, reduce nitratul la nitrit și este, în mod caracteristic, Voges–Proskauer negativ. Este nehalofil și prezintă toleranță crescută la medii alcaline, dar sensibilitate la mediile acide.

Tratamentul constă în rehidratare intensivă, orală sau intravenoasă, iar antibioterapia (de exemplu, azitromicină sau ciprofloxacină) poate reduce durata bolii și pierderile hidroelectrolitice.

Vibrio parahaemolyticus

Vibrio parahaemolyticus reprezintă a doua cea mai frecventă specie implicată în gastroenterite. Este un microorganism halofil, asociat în principal cu mediile marine și cu consumul de fructe de mare contaminate, în special stridii.

Clinic, infecția determină o gastroenterită acută autolimitată, caracterizată prin diaree apoasă, crampe abdominale și uneori vărsături. Tulpinile patogene sunt asociate cu fenomenul Kanagawa (hemoliza eritrocitelor pe agar Wagatsuma).

Pe agar TCBS, tulpinile clinice apar de obicei sub formă de colonii verzi, indicând lipsa fermentării zaharozei.

Vibrio vulnificus

Vibrio vulnificus este un patogen important, asociat cu infecții severe, inclusiv septicemie fulminantă și infecții necrozante ale plăgilor. Este un bacil Gram-negativ curbat, halofil și motil, prezent în mediile marine și în organismele marine, în special în moluște.

Transmiterea la om se realizează fie prin ingestia de fructe de mare contaminate, fie prin contactul rănilor cu apă sau produse marine contaminate.

Infecțiile se manifestă prin trei sindroame principale: septicemie primară, infecții ale plăgilor și gastroenterită. Septicemia apare frecvent la pacienții cu afecțiuni hepatice sau cu supraîncărcare cu fier și se caracterizează printr-o evoluție rapidă și o mortalitate ridicată (40–60%). Infecțiile cutanate pot evolua rapid spre celulită, necroză și septicemie.

XI. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMIENII DIN GENUL *CAMPYLOBACTER* ȘI *HELICOBACTER*

1. Genul *Campylobacter*

Familia *Campylobacteriaceae* cuprinde trei genuri: *Campylobacter*, *Arcobacter* și *Helicobacter*.

Genul *Campylobacter* include aproximativ 22 de specii, dintre care cele mai relevante clinic sunt *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*, principalele cauze de gastroenterită la om. Alte specii, precum *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. hyointestinalis* și *C. sputorum*, considerate în prezent emergente, au fost asociate atât cu infecții gastrointestinale, cât și cu afecțiuni parodontale. Aceste microorganisme colonizează în mod natural tractele digestive ale animalelor domestice și sălbatice și pot fi întâlnite frecvent în alimente de origine animală.

Din punct de vedere morfologic, *Campylobacter spp.* sunt bacili Gram-negativi, nesporulați, cu dimensiuni variabile (0,5–5 μm lungime și 0,2–0,9 μm lățime). Majoritatea speciilor sunt mobile, prezentând o mișcare caracteristică spiralată, datorată unui flagel polar situat la unul sau la ambele capete ale celulei. Există însă excepții, precum *Campylobacter gracilis*, care este nemotil, și *Campylobacter showae*, care prezintă flageli multipli. Din punct de vedere metabolic, aceste bacterii sunt microaerofile, dezvoltându-se optim în condiții reduse de oxigen.

Speciile de *Campylobacter* sunt zoonotice și pot determina atât infecții enterice, cât și infecții sistemice. *C. jejuni* reprezintă cea mai frecventă cauză de diaree bacteriană în majoritatea țărilor dezvoltate, iar *C. coli* este, de

asemenea, implicată frecvent în gastroenterite. *C. fetus*, considerată specia de referință a genului, este responsabilă de avorturi la animale (oi și bovine) și poate provoca ocazional infecții sistemice la om, inclusiv bacteriemie, în special la pacienții imunocompromiși. Alte specii, precum *C. lari* și *C. upsaliensis*, sunt implicate în diareea copiilor din țările în curs de dezvoltare, în timp ce *C. concisus* și *C. rectus* sunt asociate cu patologia parodontală.

Din punct de vedere clinic, în țările industrializate, infecția se manifestă frecvent prin diaree sanguinolentă, febră și dureri abdominale, tabloul clinic fiind adesea mai sever decât cel produs de *Salmonella* sau *Shigella*. În schimb, în țările în curs de dezvoltare, simptomatologia este caracterizată predominant prin diaree apoasă cu leucocite, febră, vărsături și deshidratare.

Infecțiile cu *Campylobacter spp.* pot fi complicate de apariția unor sechele importante, precum sindromul Guillain–Barré, artrita reactivă și sindromul de intestin iritabil. Sindromul Guillain–Barré este considerat o afecțiune autoimună determinată de reacții încrucișate între anticorpii anti-Campylobacter și structuri ale sistemului nervos periferic.

Transmiterea infecției are loc în principal pe cale fecal–orală, prin ingestia de alimente contaminate (în special carne de pasăre insuficient preparată termic), lapte nepasteurizat sau apă contaminată. De asemenea, infecția poate fi dobândită prin contact direct cu animale infectate sau prin contact sexual. Distribuția pe grupe de vârstă variază în funcție de specie: *C. jejuni* afectează predominant copiii, iar *C. fetus* este mai frecvent implicată la extremele de vârstă.

În țările în curs de dezvoltare, infecția este hiperendemică și adesea asimptomatică, cu excepția copiilor sub 2 ani, la care manifestările clinice sunt evidente. În țările dezvoltate, *Campylobacter spp.* reprezintă principala cauză bacteriană de gastroenterită, cu un vârf de incidență în sezonul cald și la începutul toamnei.

După ingestie, bacteriile colonizează și invadează mucoasa intestinală, în special la nivelul jejunului, ileonului și ileonului terminal, extinzându-se uneori la colon și rect. Pot apărea limfadenită mezenterică și bacteriemie tranzitorie.

Recoltare

Campylobacter fetus subsp. *fetus* poate fi izolat din hemoculturi. Speciile implicate în infecțiile enterice sunt recoltate, în mod obișnuit, din probe de scaun; tampoanele rectale sunt mai puțin preferate. În cazul întârzierii procesării, probele pot fi transportate în medii adecvate, precum Cary-Blair, pentru menținerea viabilității microorganismelor.

Izolare

Campylobacter fetus subsp. *fetus* este izolat frecvent din sânge și este rar implicat în infecții gastrointestinale, majoritatea cazurilor apărând la pacienți vârstnici sau imunocompromiși.

Pentru izolarea speciilor enterice, se utilizează medii selective îmbogățite, precum Campy-BAP (agar sânge), mediul Skirrow sau mediul Butzler. Variante modificate, cum ar fi mediul V sau Campy-CVA (cefoperazonă–vancomicină–amfotericină B), asigură o inhibare mai eficientă a microbiotei intestinale.

Incubarea la 37°C permite recuperarea unor specii care nu se dezvoltă la 42°C. Anumite specii, precum *C. fetus*, *C. rectus* și *C. curvus*, pot fi cultivate și pe medii uzuale. Sunt disponibile și medii pe bază de cărbune fără sânge, precum agarul cu cefoperazonă–deoxicolat. Cultura trebuie incubată în condiții microaerofile, cu umiditate crescută și medii proaspete.

Identificare

Campylobacter spp. sunt bacili Gram-negativi curbați, nesporulați, care pot avea forme spiralate, în „S” sau aspect de „aripi de pescăruș”. În culturile vechi pot apărea sub formă de coccobacili.

Colorația Gram este adesea dificilă; utilizarea carbolfuchsinei ca agent de contrast îmbunătățește vizualizarea. Motilitatea caracteristică de tip „darting” poate fi observată în preparate proaspete, în special prin microscopie cu contrast de fază. Pentru evidențierea acesteia, bacteriile trebuie suspendate în bulion (*Brucella* sau soia triptică), deoarece soluțiile saline sau apa distilată pot inhiba motilitatea.

Morfologia coloniilor

Coloniile de *C. jejuni* și alte specii enterice sunt, de obicei, umede, cu aspect fluid și tendință de extindere. Ele sunt frecvent nehemolitice și pot avea forme variate (rotunde, convexe sau plate). *C. fetus* produce colonii netede, convexe și translucide. Unele specii pot prezenta o ușoară pigmentare cafenie sau roz, iar *C. mucosalis* și *C. hyointestinalis* pot produce pigment galben murdar.

Sensibilitatea la antibiotice

Tratamentul de elecție pentru infecțiile intestinale cu *Campylobacter* constă în administrarea de macrolide (azitromicină sau eritromicină), deși majoritatea cazurilor sunt autolimitate. Fluorochinolonele pot fi utilizate ca alternativă, însă rezistența este în creștere.

În infecțiile sistemice, gentamicina este frecvent utilizată, putând fi înlocuită, în funcție de sensibilitate, cu tetraciline, macrolide sau cloramfenicol.

2. Genul *Helicobacter*

Genul *Helicobacter* include aproximativ 17 specii, majoritatea colonizând stomacul diferitelor specii de animale.

Helicobacter pylori este o bacterie Gram-negativă, spiralată, flagelată, aparținând grupului VI de ARNr, care colonizează stomacul uman. Aceasta reprezintă principalul factor de risc pentru ulcerul peptic, adenocarcinomul gastric și limfomul gastric de tip MALT (țesut limfoid asociat mucoasei).

H. pylori a fost descoperită în 1983 în Australia de către Barry Marshall și Robin Warren, pentru care aceștia au primit Premiul Nobel pentru Medicină în 2005. Ulterior, rolul său esențial în patogenizarea ulcerului peptic și a malignităților gastrice a fost rapid demonstrat. Alte specii, precum *H. cinaedi* și *H. fennelliae*, au fost asociate cu proctită și complicații septice.

Din punct de vedere morfologic și fiziologic, *H. pylori* este un bacil Gram-negativ, microaerofil, adaptat la mediul gastric. Bacteria este neinvazivă și colonizează stratul de mucus gastric, cu o mică proporție de celule aderente la epiteliul mucoasei. Forma spiralată și prezența flagelilor îi conferă mobilitate, facilitând deplasarea prin mucus.

Un element esențial al patogenității îl constituie capacitatea de a rezista mediului acid gastric, realizată în principal prin producerea unei ureaze puternic exprimate, care catalizează hidroliza ureei în amoniac, contribuind la neutralizarea acidității locale. *H. pylori* crește lent in vitro și necesită medii de cultură complexe, în condiții microaerofile.

Transmiterea infecției poate avea loc pe mai multe căi, incluzând transmiterea fecal–orală, oral–orală, gastric–orală și, posibil, sexuală.

Deși majoritatea infecțiilor gastrice sunt determinate de *H. pylori*, un număr redus de cazuri sunt atribuite altor specii de *Helicobacter*, probabil dobândite ca zoonoze. Rolul patogen al acestor specii nongastrice rămâne încă incomplet elucidat. La pacienții imunocompromiși, unele specii intestinale de

Helicobacter pot produce infecții cu manifestări similare celor cauzate de *Campylobacter*.

După colonizare, *H. pylori* persistă la nivel gastric pe termen lung și induce un proces inflamator cronic de intensitate redusă, determinând gastrită superficială cronică. Deși bacteria nu invadează direct epiteliul gastric, aceasta declanșează un răspuns imun al gazdei, cu producere de anticorpi care, însă, nu sunt protectori.

Infecția cu *H. pylori* este recunoscută ca principală cauză a gastritei cronice de tip B, precum și a ulcerului gastric și duodenal, fiind implicată și în carcinogeneza gastrică. Alte specii, precum *H. cinaedi* și *H. fennelliae*, au fost asociate cu gastroenterite, în special la pacienți imunocompromiși. De asemenea, specii precum *H. canadensis*, *H. canis*, *H. pullorum* și *H. winghamensis* au fost implicate în infecții digestive, iar *H. cinaedi* a fost izolat și din hemoculturi la pacienți cu bacteriemie sau infecție HIV.

Tratamentul infecției cu *H. pylori* a revoluționat managementul bolii ulceroase, permițând vindecarea în numeroase cazuri. Prevenirea colonizării ar putea constitui o strategie importantă de prevenție a ulcerului peptic și a neoplaziilor gastrice.

Recoltare

H. pylori poate fi izolat din probe de biopsie gastrică. Acestea trebuie transportate rapid la laborator pentru a asigura viabilitatea microorganismului. În cazul întârzierii procesării, se poate utiliza mediul Stuart. Probele tisulare pot fi, de asemenea, conservate în bulion cisteină–Brucella cu 20% glicerină și depozitate la -70°C .

Pe lângă biopsia gastrică, identificarea infecției cu *H. pylori* se poate realiza și prin utilizarea altor tipuri de probe biologice.

Probele de scaun sunt frecvent utilizate pentru detectarea antigenului fecal de *H. pylori*, metodă neinvazivă cu sensibilitate și specificitate ridicate, utilă atât pentru diagnostic, cât și pentru monitorizarea eradicării. Probele trebuie recoltate în recipiente sterile și analizate cât mai rapid sau păstrate la temperaturi de refrigerare (2–8°C) pentru perioade scurte.

De asemenea, probele de sânge pot fi utilizate în scop serologic pentru evidențierea anticorpilor anti-*H. pylori*. Aceste teste sunt utile în evaluarea expunerii la infecție, însă nu permit diferențierea între infecția activă și cea trecută, motiv pentru care au o valoare limitată în monitorizarea tratamentului.

Metodele neinvazive bazate pe probe de scaun și sânge sunt frecvent utilizate în practica clinică datorită accesibilității și caracterului lor mai puțin invaziv.

Izolare

Pentru cultivarea *H. pylori*, se utilizează atât medii neselective, precum agarul ciocolată (CHOC) sau agarul Brucella suplimentat cu sânge (de exemplu, hematii de cal), cât și medii selective, precum agarul Skirrow.

Cultura trebuie realizată pe medii proaspete și incubată în condiții microaerofile, cu umiditate crescută. Deși unele medii utilizate pentru *Campylobacter* (de exemplu Campy-BAP sau Campy-CVA) pot susține creșterea, pentru *H. pylori* sunt preferate mediile îmbogățite specifice.

Identificare

Diagnosticul infecției cu *Helicobacter pylori* se bazează frecvent pe metode indirecte.

Identificarea prezumtivă se poate realiza prin testul rapid al ureazei efectuat pe probe de biopsie gastrică. Fragmentul tisular este plasat pe un

mediu cu uree (de exemplu, uree Christensen) și incubat la 37°C; modificarea culorii indică activitatea ureazică intensă caracteristică *H. pylori*.

Alte metode diagnostice includ teste rapide comerciale (de exemplu, CLOtest, Hp Fast Rapid Urease Test sau PyloriTek), detectarea antigenului în materii fecale, examinarea histologică a biopsiei gastrice și metode moleculare, precum reacția de polimerizare în lanț (PCR).

Sensibilitatea la antibiotice

Tratamentul standard al infecției cu *H. pylori* constă într-o terapie combinată ce include un antibiotic din clasa macrolidelor, amoxicilină și un inhibitor al pompei de protoni.

Regimurile alternative pot include metronidazol, tetraciclină și săruri de bismut. Durata tratamentului este, în general, de 7–14 zile, fiind necesară pentru eradicarea completă a infecției.

XII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa este un bacil Gram-negativ, cu dimensiuni de aproximativ 0,5–0,8 μm în diametru și 1,5–3,0 μm în lungime. Majoritatea tulpinilor sunt mobile datorită prezenței unui flagel polar unic, deși unele pot prezenta doi sau trei flageli. Este un microorganism aerob, nesporulat, capabil să determine o gamă largă de infecții atât la gazde imunocompetente, cât și la cele imunocompromise.

Flagelii conțin antigene termolabile (antigen H), însă rolul anticorpilor îndreptați împotriva acestora este limitat în principal la clasificarea serologică, fără o semnificație clară în protecția imună. Izolatele clinice prezintă frecvent pili, structuri implicate în aderență și posibil în evitarea fagocitozei, contribuind astfel la colonizarea țesuturilor gazdei.

Speciile genului *Pseudomonas* sunt larg răspândite în mediul înconjurător, fiind prezente în sol, apă și vegetație. De asemenea, pot fi izolate de pe pielea, mucoasa faringiană și din tractul digestiv al indivizilor sănătoși. În mediul spitalicesc, aceste bacterii colonizează frecvent suprafețe și echipamente umede, precum chiuvete, robinete, mopuri, alimente și aparatură respiratorie. Transmiterea se realizează prin contact direct sau indirect (fomite), precum și prin ingestia de apă sau alimente contaminate.

P. aeruginosa preferă mediile umede și poate coloniza zonele umede ale pielii, fiind implicată în afecțiuni precum dermatita interdigitală sau otita externă, în special la persoanele expuse la medii acvatice.

Recoltare

Prelevarea probelor biologice pentru diagnosticul infecțiilor cu *P. aeruginosa* trebuie realizată în condiții stricte de asepsie pentru a preveni contaminarea.

Sputa se recoltează după clătirea cavității bucale cu apă sterilă, pacientul fiind instruit să expectoreze profund într-un recipient steril. Probele de urină se obțin din jetul mijlociu, după efectuarea toaletei riguroase a regiunii perineale.

Pentru hemoculturi, sângele este recoltat aseptice în flacoane destinate culturilor aerobe și anaerobe. În cazul infecțiilor cutanate, materialul purulent se prelevează din profunzimea leziunii, după curățarea tegumentului perilezional.

Exudatele respiratorii se recoltează cu ajutorul unui tampon steril introdus în cavitatea nazală iar lichidele biologice sterile (pleural, peritoneal, sinovial) sunt obținute prin puncție în condiții strict aseptice și transferate în recipiente sterile.

Izolare

Speciile din grupul *Pseudomonas fluorescens*, inclusiv *P. aeruginosa*, produc pioverdină, un pigment galben-verzui sau galben-marونیu, solubil în apă și fluorescent sub lumină ultravioletă. Majoritatea tulpinilor de *P. aeruginosa* produc și piocianină, un pigment albastru solubil în apă; combinația dintre acești pigmenți conferă coloniilor culoarea verde caracteristică.

Piocianina este un marker important de identificare, fiind produsă exclusiv de *P. aeruginosa* dintre bacilii Gram-negativi nefermentativi. Majoritatea izolatelor prezintă β -hemoliză pe agar-sânge și formează colonii applatizate, cu aspect metalic lucios.

Un alt element caracteristic este mirosul fructat, asemănător strugurilor, datorat 2-aminoacetofenonei. Alte trăsături biochimice includ capacitatea de denitrificare, reacția pozitivă la arginină dihidrolază, utilizarea citratului, metabolizarea acetamidei și capacitatea de a crește la 42°C.

Agarul cetrimidă reprezintă un mediu selectiv și diferențial utilizat frecvent pentru izolarea *P. aeruginosa*, cetrimida inhibând majoritatea altor bacterii și stimulând producția de pigmenți.

Identificare

Pseudomonas aeruginosa este un bacil Gram-negativ mobil, care se dezvoltă pe medii uzuale de laborator, inclusiv agar-sânge și agar MacConkey. Identificarea preliminară se bazează pe producerea pigmentilor caracteristici, care conferă coloniilor nuanțe variabile de verde, albastru sau galben, precum și pe aspectul lucios metalic și mirosul specific.

Din punct de vedere biochimic, bacteria nu fermentează lactoza pe agar MacConkey și este oxidază-positivă, aceste caracteristici fiind esențiale pentru identificarea rapidă în laborator.

În cazul pacienților cu fibroză chistică, unele tulpini prezintă un aspect mucoid, determinat de producerea excesivă de alginat, o exopolizaharidă implicată în formarea biofilmului și în persistența infecției.

Sensibilitatea la antibiotice

Pseudomonas aeruginosa este cunoscută pentru capacitatea sa remarcabilă de a dezvolta rezistență la antibiotice. În ultimele decenii, această rezistență a fost temporar contracarată prin introducerea unor agenți antipseudomonici eficienți.

Cu toate acestea, în prezent se observă o creștere globală a tulpinilor multirezistente, care prezintă mecanisme de rezistență față de β -lactamine,

fluorochinolone și aminoglicozide. În aceste situații, opțiunile terapeutice devin limitate, fiind necesară utilizarea unor antibiotice mai vechi, precum colistina și polimixinele, reintroduse în practica clinică pentru tratamentul infecțiilor severe.

XIII. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL *LEGIONELLA*

1. Genul *Legionella*

În anul 1976, în urma unui focar apărut în timpul unei adunări a Legiunii Americane din Philadelphia, 221 de persoane au dezvoltat pneumonie, dintre care 34 au decedat. Agentul etiologic, ulterior identificat ca *Legionella pneumophila*, a devenit primul reprezentant al familiei *Legionellaceae*.

Genul *Legionella* include în prezent peste 50 de specii și mai mult de 70 de serogrupuri. Dintre acestea, aproximativ 20 de specii au fost implicate în infecții umane. Principalul agent patogen este *L. pneumophila*, care cuprinde cel puțin 16 serogrupuri, dintre care serogrupul 1 este responsabil de majoritatea cazurilor de boală la om. Alte specii implicate frecvent în patologia umană includ *L. longbeachae* și *L. micdadei*.

Legionella spp. sunt bacili Gram-negativi, aerobi, omniprezenți în mediul acvatic, infecția fiind dobândită în principal prin inhalarea aerosolilor contaminați. Spectrul clinic variază de la infecții asimptomatice până la forme severe, potențial letale.

Diagnosticul infecției cu *Legionella* se bazează pe mai multe metode, inclusiv:

- izolarea bacteriei pe medii speciale,
- detectarea antigenului urinar,
- testul de anticorpi fluorescenți direcți (DFA),
- metode serologice și moleculare.

Patogeneză și manifestări clinice

Virulența *Legionella spp.* este determinată de capacitatea acestora de a pătrunde, supraviețui și se multiplica intracelular, în special în macrofagele alveolare. De asemenea, produc enzime și factori care contribuie la distrugerea țesuturilor.

Infecțiile pot evolua sub două forme clinice principale:

- **boala legionarilor** (pneumonie severă),
- **febra Pontiac** (formă febrilă fără afectare pulmonară).

Boala se caracterizează prin febră, tuse inițial neproductivă, cefalee, mialgii și, ulterior, prin apariția infiltratelor pulmonare, însoțite de spută purulentă sau hemoptoică. Alte manifestări pot include dispnee, frisoane, simptome gastrointestinale (diaree, greață, vărsături) și manifestări neurologice (confuzie, letargie).

În cazurile severe, poate apărea diseminarea hematogenă, cu afectarea mai multor organe (rinichi, ficat, cord, sistem nervos central, splină, măduvă osoasă), precum și bacteriemie, insuficiență renală sau hepatică.

Perioada de incubație este, în general, de 2–10 zile. Factorii de risc includ imunodepresia, bolile pulmonare cronice, fumatul și consumul excesiv de alcool.

Febra Pontiac are o perioadă de incubație mai scurtă (aproximativ 1–3 zile) și se manifestă prin simptome pseudogripale autolimitate, fără afectare pulmonară.

Epidemiologie și transmitere

Legionella spp. sunt larg răspândite în mediul natural, fiind prezente în lacuri, râuri, izvoare termale și sol umed. Colonizarea sistemelor artificiale de apă este favorizată de:

- capacitatea de multiplicare între 20°C și 43°C,
- rezistența relativă la temperaturi de până la 60°C,
- capacitatea de a forma biofilme și de a adera la suprafețe (conducte, materiale plastice, cauciuc),
- capacitatea de a supraviețui și multiplica în protozoare libere.

Transmiterea la om se realizează prin inhalarea aerosolilor contaminați (de exemplu, dușuri, sisteme de climatizare, turnuri de răcire) sau, în cazul *L. longbeachae*, prin expunerea la sol contaminat. Transmiterea interumană nu a fost demonstrată.

Recoltare

Probele pentru diagnostic includ sputa, lavajul bronhoalveolar și aspiratele bronșice. Alte probe (țesuturi sau lichide biologice) pot fi utilizate în funcție de contextul clinic.

Este important de menționat că sputa purulentă nu este întotdeauna optimă pentru diagnostic. Probele trebuie recoltate în recipiente sterile și transportate rapid. În cazul întârzierii procesării (peste 2 ore), acestea trebuie refrigerate pentru a preveni suprad dezvoltarea microbiotei contaminante.

Urina reprezintă o probă importantă pentru detectarea antigenului, în special pentru *L. pneumophila* serogrupul 1. Probele urinare se păstrează la 2–8°C sau se congelează la –20°C dacă analiza este amânată.

Izolare

Cultura rămâne metoda de referință pentru diagnosticul infecției cu *Legionella*. Pentru îmbunătățirea izolării, probele contaminate (de exemplu, sputa) pot fi tratate acid (KCl-HCl 0,2 N) timp de aproximativ 5 minute, pentru reducerea florei bacteriene asociate.

Bacteriile sunt fastidioase și necesită medii speciale care conțin L-cisteină. Nu se dezvoltă pe agar sânge standard (SBA). Mediul optim este agarul BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) suplimentat cu L-cisteină și fier.

Incubarea se realizează la 35–37°C, iar coloniile devin vizibile în 3–5 zile, uneori până la 7 zile.

Identificare

Microscopic, *Legionella spp.* sunt bacili Gram-negativi pleomorfici, slab colorabili, cu dimensiuni aproximative de 1–2 μm × 0,3–0,5 μm.

Pe agar BCYE, coloniile apar ca formațiuni convexe, netede, de culoare alb-cenușie până la albastru-verzuie, cu diametrul de 2–4 mm. Coloniile tinere pot prezenta un aspect caracteristic de „sticlă șlefuită”.

Examinarea zilnică este necesară, deoarece coloniile își pot modifica aspectul în timp. Unele tulpini pot prezenta fluorescență slabă la lumină ultravioletă.

Sensibilitatea la antibiotice

Infecțiile cu *Legionella* răspund favorabil la tratament atunci când sunt diagnosticate precoce. Terapia de primă linie include macrolide (de exemplu, azitromicina) sau fluorochinolone.

Diagnosticul și tratamentul precoce sunt esențiale, în special în infecțiile nosocomiale, care afectează frecvent pacienți imunocompromiși și pot evolua sever.

Doxiciclina reprezintă o alternativă terapeutică în anumite situații.

XIV. DIAGNOSTIC DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN GENUL *HAEMOPHILUS SI PASTERURELLA*

1. Genul *Haemophilus*

Genul *Haemophilus* include numeroase specii implicate într-o gamă variată de infecții, caracterizate printr-o morfologie relativ uniformă și prin necesitatea unor factori de creștere derivați din sânge, de unde și denumirea genului (*Haemophilus* – „iubitor de sânge”).

Speciile de *Haemophilus* sunt coccobacili Gram-negativi, care prezintă caracteristici ultrastructurale similare altor bacili Gram-negativi. Peretele celular conține lipooligozaharidă, analogă lipopolizaharidei, însă cu lanțuri laterale mai scurte. Genul este heterogen, incluzând atât agenți patogeni pentru om și animale, cât și specii comensale ale mucoaselor.

Aceste bacterii nu produc toxine sau produse extracelulare evidente care să explice în mod direct patogenitatea lor. Pentru creștere, necesită factori specifici: hemina (factorul X) și/sau nicotinamidă adenină dinucleotidă – NAD⁺ (factorul V). Majoritatea speciilor se dezvoltă optim într-o atmosferă îmbogățită cu CO₂; de exemplu, *H. ducreyi* și unele tulpini netipizate de *H. influenzae* nu formează colonii vizibile în absența acestor condiții.

***Haemophilus influenzae* și alte specii**

Haemophilus influenzae, principalul agent patogen al genului, poate fi clasificat în tulpini încapsulate (tipizabile) și tulpini neîncapsulate (netipizate). Tulpinile încapsulate sunt împărțite în șapte tipuri (a–f), pe baza structurii antigenice a polizaharidei capsulare. Dintre acestea, tipul b (*H. influenzae* tip

b – Hib) este cel mai virulent, fiind frecvent implicat în bacteriemie și meningită, în special la copiii sub 2 ani.

Tulpinile netipizate sunt implicate predominant în infecțiile tractului respirator superior și inferior la toate grupele de vârstă.

Alte specii de *Haemophilus* sunt mai rar implicate în patologia umană:

- *H. parainfluenzae* poate produce pneumonie sau endocardită,
- *H. ducreyi* este agentul etiologic al chancroidului, o infecție cu transmitere sexuală,
- *H. aphrophilus* (actual inclus în genul *Aggregatibacter*) face parte din flora orală și poate determina endocardită,
- *H. aegyptius* este asociat cu conjunctivita și febra purpurică braziliană,
- *H. haemolyticus*, anterior diferențiat prin proprietăți hemolitice, este considerat în prezent apropiat de tulpinile netipizate de *H. influenzae*.

H. influenzae colonizează frecvent tractul respirator superior la indivizi sănătoși și se transmite prin contact direct, secreții respiratorii sau aerosoli. *H. ducreyi* se transmite prin contact sexual. Nu există un rezervor animal semnificativ pentru aceste microorganisme.

Recoltare

Probele biologice utilizate pentru diagnosticul infecțiilor cu *Haemophilus spp.* includ secreții din tractul respirator inferior, sânge, lichid cefalorahidian și exudat faringian. Recoltarea trebuie realizată în condiții sterile, pentru a evita contaminarea și a asigura acuratețea rezultatelor.

Izolare

Izolarea *Haemophilus spp.* se realizează pe medii de cultură îmbogățite. Agarul cu ciocolată este frecvent utilizat, deoarece furnizează factorii de

creștere hemină și nicotinamidă adenină dinucleotidă necesari dezvoltării bacteriei.

Probele sunt însămânțate pe acest mediu și incubate la 35–37°C, într-o atmosferă cu 5–10% CO₂, timp de 24–48 de ore.

Pentru diferențierea speciilor, se pot utiliza teste bazate pe necesarul de factori de creștere sau sensibilitatea la bacitracină; de exemplu, *H. influenzae* este sensibil la bacitracină, ceea ce poate orienta identificarea.

Identificare

Coloniile de *Haemophilus spp.* care cresc pe agar-sânge sunt, în general, foarte mici (sub 1 mm în diametru după 24 de ore de incubare), netede, gri și nepigmentate.

O excepție o constituie coloniile de *H. somnus* (actual *Histophilus somni*), care pot avea o colorație gălbuie, mai ales atunci când sunt manipulate sau cresc în culturi confluențe.

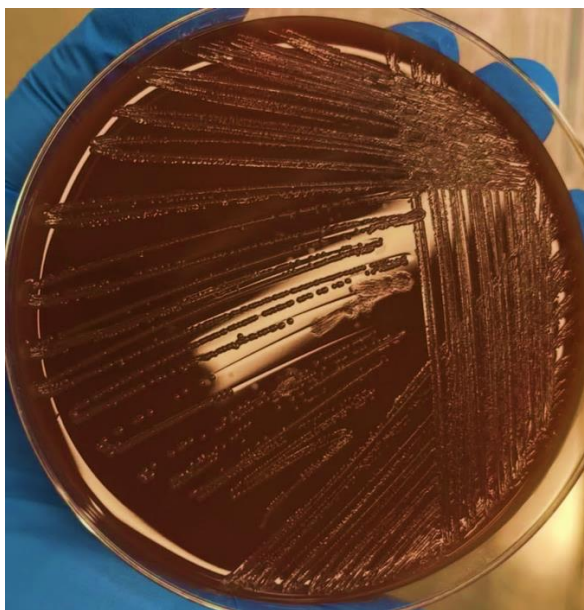


Figura 14. Identificare *Haemophilus influenzae* – mediul agar-chocolate.

Sensibilitate la antibiotice

Rezistența la ampicilină, mediată prin producerea de β -lactamază, este larg răspândită în rândul *Haemophilus influenzae*. În schimb, rezistența la cefalosporinele de generația a III-a (de exemplu, ceftriaxonă și cefotaximă), care nu sunt semnificativ afectate de această enzimă, rămâne rară.

În aceste condiții, testarea de rutină a sensibilității antimicrobiene a izolatelor clinice nu este întotdeauna necesară pentru ghidarea terapiei.

Pe lângă producerea de β -lactamază, a fost descris și un mecanism de rezistență determinat de modificarea proteinelor de legare a penicilinei (PBP), care poate reduce eficacitatea β -lactamelor, inclusiv a combinațiilor cu inhibitori de β -lactamază și a cefalosporinelor de generația I și II. Acest mecanism este însă mai puțin frecvent, iar impactul său clinic nu este pe deplin elucidat.

Totuși, *H. influenzae* poate dezvolta rezistență și la alte clase de antimicrobiene, ceea ce subliniază potențialul apariției unor tulpini cu rezistență multiplă.

2. Genul *Pasteurella*

Speciile din genul *Pasteurella* sunt coccobacili Gram-negativi de dimensiuni mici, nemotili, anaerobi facultativi, care pot apărea sub formă ovoidală, bacilară sau filamentoasă și prezintă frecvent colorare bipolară caracteristică.

Pasteurella multocida prezintă mai multe tipuri capsulare (A, B, D, E și F), iar antigenele somatice pot fi evidențiate după îndepărtarea capsulei prin tratamente specifice. Alte specii, precum *Pasteurella haemolytica* (în prezent reclassificată ca *Mannheimia haemolytica*), sunt implicate în infecții la animale, în special la bovine și cabaline.

Pasteurelloza este o zoonoză transmisă la om prin contact cu animale infectate sau cu produse de origine animală contaminate. Deși pot apărea forme sistemice (septicemie, endocardită, artrită, osteomielită, meningită) sau infecții respiratorii, cea mai frecventă formă clinică este infecția cutanată și a țesuturilor moi, de obicei în urma mușcăturilor sau zgârieturilor de animale. Aceste infecții sunt frecvente deoarece *Pasteurella spp.* colonizează cavitatea bucală și tractul respirator al multor mamifere și păsări.

Au fost descrise cel puțin 17 specii de *Pasteurella*, unele fiind apropiate genetic de alte genuri, precum *Actinobacillus*. Printre speciile relevante clinic se numără *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis* și *P. pneumotropica*.

P. multocida, cea mai frecvent izolată specie la om, este responsabilă în principal de infecții ale pielii și țesuturilor moi. Aceasta include mai multe subspecii (*multocida*, *septica*, *gallicida*) și este clasificată în serogrupuri capsulare (A, B, D, E și F). Alte specii, precum *P. canis*, *P. stomatis* și *P. dagmatis*, sunt de asemenea asociate cu infecții umane, în special în contextul contactului cu câini și pisici.

Infecțiile determinate de *P. multocida* apar cel mai frecvent după mușcături sau zgârieturi de animale domestice (în special câini și pisici), dar pot fi asociate și cu alte animale, precum rozătoare, cai sau iepuri. Deși, în mod obișnuit, determină infecții locale ale țesuturilor moi, pot apărea și forme invazive severe, cum ar fi bacteriemia, meningita sau endocardita, mai ales la vârstnici, nou-născuți, persoane imunocompromise sau cu boli pulmonare cronice.

Din punct de vedere microbiologic, *Pasteurella spp.* prezintă frecvent colorare bipolară („aspect de ac de siguranță”). Majoritatea sunt catalază- pozitive și oxidază- pozitive și fermentează glucoza cu producere de acid, fără formare de gaz.

Aceste bacterii cresc pe agar sânge (SBA) și agar ciocolată (CHOC), formând colonii gri-cenușii, însă nu se dezvoltă pe agar MacConkey. Creșterea pe agar sânge în cultură pură, fără fenomen de satelitism, împreună cu colorarea bipolară, permite diferențierea față de genul *Haemophilus*.

P. multocida formează colonii nehemolitice pe agar sânge, care pot deveni mucoide după 24 de ore de incubare la 37°C, iar după 48 de ore poate apărea un halou discret verzuie-marونیu în jurul coloniilor.

Pasteurella bettyae este o specie mai rar izolată, identificată în probe precum placentă, lichid amniotic, sânge sau secreții urogenitale. Aceasta este un coccobacil fastidios, capnofil, anaerob facultativ, care fermentează glucoza și fructoza, este catalază-pozitiv, oxidază-variabil și indol-pozitiv. Spre deosebire de majoritatea speciilor de *Pasteurella*, poate crește și pe agar MacConkey.

Sensibilitatea la antibiotice

Infecțiile cu *Pasteurella multocida* sunt, în general, sensibile la penicilină, aceasta reprezentând tratamentul de primă intenție. În cazuri rare de rezistență, pot fi utilizate cefalosporinele de generația a II-a și a III-a, fluorochinolonele sau tetraciclinele.

XV. DIAGNOSTIC DE LABORATOR

AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENII DIN

GENURILE *BORDETELLA*, *BRUCELLA* SI *FRANCISELLA*

1. Genul *Bordetella*

Membrii genului *Bordetella* sunt bacili mici sau coccobacili Gram-negativi. Toate speciile sunt strict aerobe și se dezvoltă optim la temperaturi cuprinse între 35°C și 37°C. Din punct de vedere metabolic, acestea sunt relativ inactice: nu fermentează carbohidrații, nu utilizează aminoacizii ca sursă energetică și prezintă o activitate biochimică redusă. Majoritatea tulpinilor sunt catalază-pozitive, deși reacția poate fi variabilă în cazul *Bordetella pertussis*.

B. pertussis este un microorganism fastidios, care necesită condiții speciale de recoltare, transport și cultivare. Creșterea sa este inhibată de acizi grași, ioni metalici, sulfuri și peroxizi, compuși frecvent prezenți în mediile de cultură obișnuite.

Habitatul natural al *B. pertussis* și *B. parapertussis* este mucoasa tractului respirator uman, transmiterea realizându-se exclusiv pe cale interumană, prin picături respiratorii. Tusea convulsivă (pertussis) rămâne o boală frecventă și severă în populațiile nevaccinate.

B. pertussis și *B. parapertussis* sunt agenții etiologici ai tusei convulsive, în timp ce alte specii, precum *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* și *B. trematum*, determină infecții umane în condiții particulare.

Manifestări clinice

Infecția cu *B. pertussis* survine după inhalarea bacteriei și are o perioadă de incubație de 7–10 zile (interval posibil: 1–3 săptămâni). Evoluția clinică se desfășoară în trei faze:

- **Faza catarală:** debut insidios, cu simptome nespecifice (rinoree, strănut, tuse ușoară, uneori conjunctivită). La sugari pot apărea apnee și detresă respiratorie. Această fază este cea mai contagioasă.
- **Faza paroxistică:** caracterizată prin accese repetate de tuse severă, urmate de inspirul zgomotos caracteristic („whoop”). Episoadele pot fi însoțite de vărsături și pot apărea de mai multe ori pe zi. Sugarii pot dezvolta complicații severe, precum apnee sau pneumonie.
- **Faza de convalescență:** apare după aproximativ 4 săptămâni și se caracterizează prin reducerea treptată a frecvenței și intensității tusei. Recuperarea completă poate dura săptămâni sau luni.

Infecția cu *B. parapertussis* are, în general, o evoluție similară, dar mai puțin severă.

Recoltare și izolare

Diagnosticul microbiologic se bazează pe recoltarea de tampoane sau aspirate nazofaringiene. Tamponurile trebuie introduse profund până la nivelul nazofaringelui și realizate din materiale adecvate (dacron sau alginat de calciu).

Probele trebuie transportate rapid, de preferință pe medii de transport speciale. Mediul Regan–Lowe (agar cărbune-sânge) este utilizat frecvent și a înlocuit în mare măsură mediul Bordet–Gengou, care conține sânge, extract de cartofi și glicerol.

Pentru cultivare, *B. pertussis* necesită medii îmbogățite care conțin substanțe protectoare (cărbune, sânge sau amidon). De asemenea, se poate utiliza bulionul Stainer–Scholte ca mediu de îmbogățire.

Detectarea ADN-ului prin PCR reprezintă o metodă sensibilă și rapidă de diagnostic. Răspunsul imun umoral devine detectabil începând cu săptămâna a treia de boală, iar anticorpii pot fi evidențiați prin metode imunoenzimatic.

Alte specii de *Bordetella* sunt mai puțin fastidioase și pot crește pe medii uzuale, inclusiv agar MacConkey.

Identificare

La examenul microscopic, bacteriile apar ca coccobacili Gram-negativi mici. Morfologia poate varia în funcție de mediul de cultură.

Identificarea se realizează prin teste serologice (aglutinare sau imunofluorescență) sau metode moleculare.

Coloniile de *B. pertussis* pe mediile selective (Regan–Lowe, Bordet–Gengou) sunt mici, netede, lucioase, cu aspect caracteristic de „picături de mercur”, devenind ulterior gri-albicioase.

2. Genul *Brucella*

Speciile de *Brucella* sunt coccobacili Gram-negativi mici, aerobi, nemotili, capabili să producă infecții la numeroase specii animale și la om. Printre speciile patogene pentru om se numără:

- *Brucella melitensis* (ovine, caprine),
- *Brucella suis* (porcine),
- *Brucella abortus* (bovine).

Alte specii, precum *B. ovis*, *B. neotomae* sau *B. canis*, au relevanță limitată sau variabilă pentru patologia umană.

Bruceloza este o zoonoză cunoscută și sub denumirile de febră undulantă, febră de Malta sau boala Bang. Transmiterea se realizează prin ingestia de produse lactate nepasteurizate, inhalare sau pătrundere prin leziuni cutanate.

Infecția se caracterizează prin diseminare hematogenă și afectarea mai multor organe (ficat, splină, SNC, măduvă osoasă). Manifestările clinice includ febră recurentă, transpirații nocturne, frisoane, mialgii și stare generală alterată. Evoluția poate fi cronică, cu recidive frecvente.

Recoltare și izolare

Manipularea probelor suspecte necesită condiții de biosecuritate ridicată. Măduva osoasă reprezintă proba optimă pentru izolare, însă pot fi utilizate și sângele, țesuturile sau materialele purulente.

Brucella spp. cresc lent, necesitând perioade de incubare prelungite (până la 7 zile sau mai mult), în atmosferă cu CO₂. Hemoculturile pot necesita incubare de până la 10 zile.

Bacteriile se dezvoltă pe agar sânge și agar ciocolată în 48–72 de ore, formând inițial colonii punctiforme care cresc progresiv.

Identificare

Identificarea prezumtivă se bazează pe caracteristicile morfologice și biochimice: bacterii Gram-negative mici, catalază-pozitive, oxidază-pozitive, urează-pozitive, reduc nitrații și sunt nemotile.

Coloniile sunt mici, netede, convexe, nepigmentate și nehemolitice.

3. *Francisella Tularensis*

Francisella Tularensis este un coccobacil Gram-negativ responsabil de tularemie, o zoonoză descrisă inițial în 1911 în California.

Boala este prezentă în emisfera nordică și poate evolua sub mai multe forme clinice: ulceroglandulară (cea mai frecventă), glandulară, oculoglandulară, pneumonică sau septicemică.

Infecția este transmisă prin contact direct cu animale infectate, mușcături de artropode (căpușe, țânțari) sau inhalare. Forma ulceroglandulară se manifestă printr-un ulcer cutanat nedureros și adenopatie regională dureroasă.

Diagnosticul se bazează în principal pe metode serologice (aglutinare), deoarece microorganismul este dificil de evidențiat prin colorație Gram. Testele de imunofluorescență pot oferi un diagnostic rapid în anumite situații.

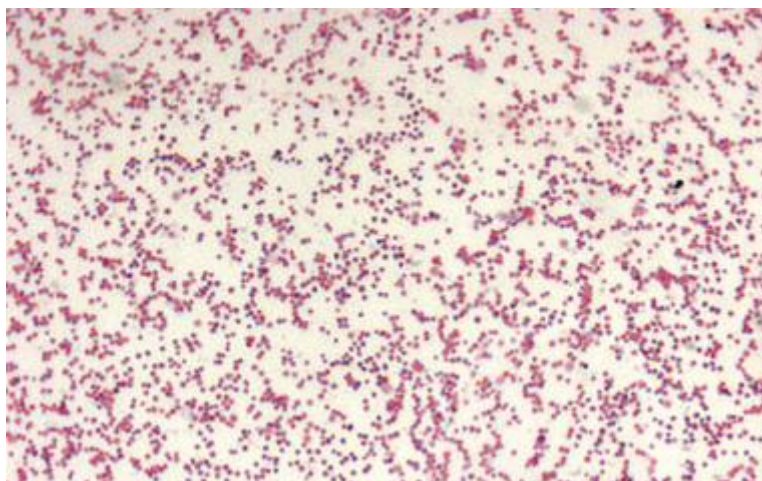


Figura 15. Colorație Gram *Francisella Tularensis*

Recoltare



Figura 16. *Francisella Tularensis* pe mediu de agar-ciocolată

Recoltare

La pacienții febrili se recomandă recoltarea de hemoculturi. În prezența leziunilor cutanate, se pot preleva biopsii sau probe de la nivelul marginii active a leziunii, acestea fiind destinate atât culturii, cât și examinării directe.

În situațiile în care tabloul clinic sau istoricul pacientului sugerează tularemie, laboratorul trebuie informat în mod explicit, având în vedere riscul biologic crescut asociat manipulării acestui agent patogen.

Francisella tularensis, agentul etiologic al tularemiei, poate fi izolat eficient din probe de sânge recoltate în flacoane de hemocultură îmbogățite cu L-cisteină și glucoză, necesare pentru dezvoltarea bacteriei.

Izolare

Izolarea *F. tularensis* în laborator are o importanță deosebită, necesitând măsuri stricte de biosecuritate datorită caracterului său extrem de infecțios și riscului profesional pentru personalul de laborator.

La examinarea microscopică prin colorație Gram, microorganismul apare sub forma unui coccobacil Gram-negativ mic, pleomorf și slab colorabil.

F. tularensis este o bacterie fastidioasă, necesitând cisteină pentru creștere optimă. Dezvoltarea sa este favorizată pe medii îmbogățite cu cisteină, precum agarul ciocolată (CHOC), mediul Thayer–Martin modificat, agarul inimă-cisteină și agarul extract de drojdie cu cărbune tamponat (BCYE). Probele utilizate pentru cultivare pot proveni din leziuni, sânge sau spută.

Identificare

Creșterea *F. tularensis* este lentă, coloniile devenind vizibile pe medii solide după 36–48 de ore de incubare sau chiar mai târziu. Microorganismul nu se dezvoltă pe agar MacConkey.

Prezența unor coccobacili Gram-negativi pleomorfi, slab colorabili, proveniți din hemoculturi și care nu cresc sau cresc foarte slab pe agar sânge, trebuie să ridice suspiciunea de *F. tularensis*.

Din punct de vedere biochimic, *F. tularensis* este catalază-positivă și poate produce β -lactamază, dar este oxidază-negativă, urează-negativă și nu necesită factorii de creștere X și V.

Izolatele suspecte trebuie considerate prezumtiv ca aparținând speciei *F. tularensis* și trimise către un laborator de referință pentru confirmare definitivă.

Sensibilitate la antibiotice

Streptomicina cu sau fără tetracilină a fost tratamentul tradițional, dar din cauza potențialului de ototoxicitate și nefrotoxicitate, streptomicina este în general rezervată cazurilor mai grave. Doxiciclina și fluorochinolonele sunt tratamente eficiente pentru cazurile necomplicate.

XVI. DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC ÎN INFECȚIILE PRODUSE DE GERMIANI ANAEROBI

1. Protocolul diagnosticului de laborator în infecțiile produse de germeni anaerobi

Germenii anaerobi sunt bacterii care se dezvoltă în absența oxigenului și pot cauza infecții grave, adesea mixte, alături de bacterii aerobe. În mod normal, acești microbi fac parte din flora comensală a cavităților precum tractul gastrointestinal, vaginal sau cavitatea bucală. Totuși, în anumite condiții (traume, intervenții chirurgicale, ischemii), aceștia pătrund în țesuturi sterile și provoacă infecții greu de tratat, cum ar fi:

- Abcese cerebrale, pulmonare, intraabdominale
- Infecții postoperatorii
- Gangrenă gazoasă
- Infecții ginecologice (ex. endometrite, salpingite)

Diagnosticul acestor infecții este dificil, din cauza fragilității germenilor anaerobi și a cerințelor speciale de recoltare, transport și cultivare.

Etapile diagnosticului de laborator

1. Recoltarea corectă a probelor

Recoltarea este o etapă critică, deoarece germenii anaerobi sunt rapid inactivați la contactul cu oxigenul.

De aceea:

- Se evită folosirea tampoanelor, care permit pătrunderea oxigenului.

- Probele ideale sunt:
 - Aspirate cu seringă din abcese
 - Lichide biologice sterile (peritoneal, pleural)
 - Țesut necrozat sau biopsii profunde
- Recoltarea se face în condiții sterile, direct din zona infectată, de preferat de către medic.

2. Transportul în laborator

Proba trebuie transportată rapid (sub 1–2 ore), la temperatura camerei, în medii speciale:

- Mediu thioglicolat – reduce oxigenul
- Tuburi de transport anaerob – flacoane cu atmosferă vidată
- Sisteme de hemoculturi anaerobe, când e suspectată bacteriemia anaerobă

Probele **NU** se refrigerează – temperaturile scăzute afectează viabilitatea anaerobilor.

Prelucrarea și cultivarea germenilor anaerobi

1. Inocularea probelor

Se face imediat ce proba ajunge în laborator, în condiții anaerobe.

Probele se însămânțează pe:

- Agar sânge anaerob – mediu de bază
- Mediu Schaedler – îmbogățit pentru anaerobi exigenți
- Medii selective – conțin antibiotice pentru a inhiba flora aeroba (ex. kanamicină-vancomicină agar)

2. Anaerobioza – metode de cultivare în absența oxigenului

A. Anaerobarul (borcanul anaerob)

Este o metodă clasică de cultivare a anaerobilor.

Funcționare:

- Probele inoculate pe medii de cultură se introduc în anaerojar, un recipient etanș.
- În interior se adaugă un sistem generant de anaerobioză, cum ar fi:
 - Pliculețe cu bicarbonat și acid citric + catalizator (ex. sistem GasPak)
 - Acestea generează CO₂ și consumă oxigenul
- Se folosește un indicator de anaerobioză (ex. rezazurin) – devine incolor în lipsa O₂

Avantaje:

- Ușor de utilizat
- Nu necesită echipamente sofisticate

Limite:

- Etanșitatea este esențială
- Capacitate limitată

B. Camera anaerobă (anaerostat)

Este o incintă mare, închisă ermetic, în care se creează o atmosferă lipsită de oxigen, cu gaz protector (ex. 80% N, 10% H, 10% CO).

Avantaje:

- Permite manipularea continuă a culturilor fără expunere la aer
- Ideală pentru laboratoare specializate

Limite:

- Costisitoare
- Necesită personal instruit

3. Incubarea

Culturile se incubă la 35–37°C timp de minimum 5 zile, în unele cazuri până la 10 zile, în funcție de specia suspectată.

Identificarea germenilor anaerobi

După apariția coloniilor, se efectuează:

1. Examen microscopic (colorare Gram)

Permite clasificarea preliminară:

- Bacili Gram-pozitivi (ex. *Clostridium*)
- Bacili Gram-negativi (ex. *Bacteroides*)
- Coci anaerobi (ex. *Peptostreptococcus*)

2. Teste biochimice și automatizate

- API 20A, RapID ANA II – identificare manuală
- MALDI-TOF – rapid, precis, utilizat în laboratoare moderne

3. Identificare moleculară

- PCR pentru specii greu cultivabile
- Detectarea genelor de rezistență sau virulență

Testarea sensibilității la antibiotice

Nu se efectuează întotdeauna, dar este importantă în cazuri severe sau neobișnuite.

Metode:

- E-test pe agar anaerob
- Dilutii în agar – standard CLSI
- Sisteme automate (VITEK 2 ANC)

Antibiotice frecvent testate:

- Metronidazol (eficace pentru majoritatea anaerobilor)
- Clindamicină
- Carbapeneme (imipenem, meropenem)
- Beta-lactamine + inhibitori (ex. piperacilină-tazobactam)

Interpretarea și raportarea rezultatelor

Un raport complet conține:

- Identificarea microorganismului
- Rezultatul antibiogramei (dacă este disponibilă)
- Recomandare terapeutică

Este importantă comunicarea directă cu clinicianul, mai ales dacă se suspectează infecții mixte sau dacă este implicat un germene anaerob rar.

Diagnosticul infecțiilor anaerobe necesită respectarea strictă a procedurilor de recoltare, transport și cultivare. Utilizarea anaerojarului sau a camerei anaerobe este indispensabilă pentru izolarea corectă a acestor germeni. Identificarea rapidă și corectă, completată de testarea sensibilității la antibiotice, contribuie decisiv la conduita terapeutică adecvată și la reducerea mortalității asociate acestor infecții.

2. Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de genul *Clostridium*

Genul *Clostridium* este un grup de bacterii anaerobe, gram-pozitive, care aparțin familiei *Clostridiaceae*. Aceste bacterii sunt cunoscute pentru capacitatea lor de a forma spori, ceea ce le permite să supraviețuiască în condiții nefavorabile pentru perioade îndelungate.

Caracteristici generale ale genului *Clostridium*:

- Gram-pozitive (deși pot apărea Gram-negative în culturi vechi)
- Anaerobe stricte
- Capacitatea de a forma spori
- Formă de bastonaș (bacili)
- Se găsesc frecvent în sol, sedimente marine și intestinul uman

Specii importante din genul *Clostridium*:

1. *Clostridium botulinum*

- Produce toxina botulinică (una dintre cele mai puternice toxine cunoscute)
- Cauzează botulismul

2. *Clostridium tetani*

- Produce toxina tetanică
- Cauzează tetanusul

3. *Clostridium perfringens*

- Implicat în gangrena gazoasă și intoxicații alimentare
- Produce multiple toxine, inclusiv toxina alfa

4. *Clostridium difficile*

- Asociat cu colita pseudomembranoasă, în special după tratamente antibiotice
- Produce toxinele A și B

5. *Clostridium septicum*, *C. sordellii*

- Patogeni oportuni, pot cauza infecții grave în anumite condiții.

Diagnosticul de laborator joacă un rol esențial în identificarea rapidă și corectă a acestor agenți patogeni, pentru a permite instituirea tratamentului specific și măsurilor de izolare, mai ales în infecțiile toxigene. Din cauza riscurilor severe asociate cu toxinele produse de anumite specii de *Clostridium*, un diagnostic precoce și precis este vital.

Considerații generale privind diagnosticul infecțiilor clostridiene

Înainte de a trece la metodele specifice de laborator, este important să subliniem câteva caracteristici importante ale acestor infecții:

- Sunt adesea infecții endogene, provenind din flora intestinală proprie (ex: *C. difficile*)
- Pot fi exogene, prin contaminarea rănilor (ex: *C. tetani*, *C. perfringens*)
- Unele infecții sunt toxiinfecții alimentare (ex: *C. botulinum*)
- Diagnosticarea necesită adesea o combinație de examen microscopic, culturi speciale, testarea toxinelor și metode moleculare.

1. Recoltarea și transportul probelor

Pentru un diagnostic corect, recoltarea și transportul probelor sunt importante. Deoarece *Clostridium* este un gen de bacterii anaerobe, este important ca probele să fie păstrate și transportate în condiții anaerobe pentru a menține viabilitatea microorganismelor.

Tipuri de probe:

- Fecale (pentru *C. difficile* și *C. botulinum*)
- Sânge (în caz de septicemie)
- Exsudat din plagă sau țesut necrozat (pentru *C. perfringens*, *C. tetani*)
- Conținut gastric sau alimente suspecte (pentru botulism alimentar)

Condiții de transport:

- Sisteme de transport anaerob (ex. tuburi cu medii de reducere)
- Recoltare cu instrumente sterile, în condiții aseptice
- Procesarea cât mai rapidă posibil, ideal în decurs de 2 ore de la recoltare

2. Examenul microscopic

Colorarea Gram

Clostridium apare sub formă de bacili Gram-pozitivi, cu capete rotunjite, dar uneori se pot colora Gram-negativ în culturi vechi sau în condiții improprie. Sporii apar ca structuri ovale, incolore în interiorul sau la capetele bacteriei.

- *C. tetani* – aspect de „rachetă de tenis” datorită poziției terminale a sporului
- *C. perfringens* – bacili mari, fără spori vizibili în culturi recente
- *C. difficile* – bacili cu spori subterminali, vizibili mai ales în medii speciale

Examenul direct este util pentru evaluarea rapidă a prezenței bacteriilor și orientarea diagnosticului.

3. Cultura bacteriană

Condiții generale:

- Medii de cultură speciale pentru anaerobi: mediu thioglicolat, agar sânge anaerob, mediu Schaedler
- Incubare la 35–37°C în atmosferă strict anaerobă, timp de 24–72 de ore

Aspecte coloniale specifice:

- *C. perfringens* – colonii mari, opace, cu hemoliză dublă pe agar sânge
- *C. difficile* – colonii neregulate, cu miros caracteristic de cal
- *C. tetani* – colonii translucide, strălucitoare
- *C. botulinum* – creștere lentă, necesită medii selective speciale

Medii selective:

- *C. difficile* – mediu CCFA (cycloserine-cefoxitin-fructose agar)
- *C. perfringens* – medii cu neomicină sau ou pentru detectarea lecitinazei
- *C. botulinum* – medii speciale (ex. TPGY) și incubare prelungită

4. Identificarea biochimică

După izolarea coloniilor suspecte, identificarea se face prin:

- Teste de fermentare a zaharurilor
- Activitatea enzimatică: lecitinază, lipază, gelatinază, urează
- Producerea de gaz din glucoză
- Reacții specifice (Nagler – pentru lecitinază)

Sistemele automate (ex. VITEK, MALDI-TOF MS) pot fi utilizate pentru identificare rapidă și precisă.

5. Detectarea toxinelor

Este componenta esențială a diagnosticului pentru unele infecții clostridiene. Multe dintre manifestările clinice sunt cauzate de toxinele produse de aceste bacterii, nu de infecția bacteriană propriu-zisă.

Metode:

- Testul ELISA – pentru toxinele A și B ale *C. difficile*, toxina botulinică
- PCR – pentru genele care codifică toxinele (tcdA, tcdB, boNT, tetX)
- Neutralizarea pe șoarece – test clasic pentru toxina botulinică, încă folosit în unele laboratoare de referință
- Citotoxicitate in vitro – utilizat pentru toxina *C. difficile* pe culturi celulare (ex: linii celulare HeLa sau Vero)

6. Teste moleculare

Metodele genetice au devenit tot mai frecvente în laboratoare, oferind rezultate rapide și specifice.

- PCR (reacția de polimerizare în lanț) – detectează genele codificatoare ale toxinelor sau gene specifice speciei
- qPCR – oferă și cuantificare (important în *C. difficile*)
- Multiplex PCR – permite detectarea simultană a mai multor specii și toxine

- Secvențiere genomică – în cercetare sau pentru urmărirea focarelor epidemiologice

7. Teste de susceptibilitate la antibiotice

În general, speciile din genul *Clostridium* sunt sensibile la:

- Metronidazol
- Vancomicină (în special *C. difficile*)
- Peniciline (în special *C. perfringens*)
- Clindamicină (cu rezistențe emergente)

Testarea sensibilității se face rar de rutină, dar poate fi necesară în infecții recurente sau severe.

8. Exemple de diagnostic pentru principalele specii

a) *Clostridium difficile*

- Proba: scaun
- Teste: ELISA pentru toxine A și B, PCR, cultură pe CCFA
- Cultura nu este întotdeauna suficientă – este nevoie de testarea toxinelor

b) *Clostridium perfringens*

- Proba: țesut necrozat sau secreții din plagă
- Cultura pe agar sânge, hemoliză dublă
- Test Nagler pentru lecitinază
- PCR pentru genele de toxine (toxina alfa, enterotoxină)

c) *Clostridium botulinum*

- Proba: ser, conținut gastric, fecale, alimente suspecte
- Test ELISA / PCR pentru toxina botulinică
- Test pe șoarece în laboratoare specializate

d) *Clostridium tetani*

- Proba: exsudat din plagă
- Cultura este dificilă
- Diagnosticul este în principal clinic, confirmarea de laborator e secundară

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de genul *Clostridium* este complex, necesitând o combinație de metode tradiționale și moderne. Deși cultura și identificarea biochimică rămân importante, în cazul speciilor toxigene, testarea toxinelor și metodele moleculare sunt esențiale pentru un diagnostic precis.

Importanța unui diagnostic rapid este majoră, având în vedere severitatea potențială a acestor infecții. De aceea, laboratoarele de microbiologie trebuie să fie echipate corespunzător și personalul bine instruit pentru a putea gestiona cu promptitudine astfel de cazuri.

3. Diagnosticul de laborator al Germenilor anaerobi endogeni, nesporulați

Clasificare generală a germenilor anaerobi nesporulați

1. Bacili gram-negativi

Bacteroides spp.

→ *Bacteroides fragilis* (cel mai frecvent implicat în infecții)

Prevotella spp.

Porphyromonas spp.

Fusobacterium spp.

2. Bacili gram-pozitivi

Actinomyces spp.

Propionibacterium spp. (Cutibacterium acnes)

Eubacterium spp.

Lactobacillus spp. (în unele cazuri)

3. Coci gram-pozitivi

Peptostreptococcus spp.

Anaerococcus spp.

4. Coci gram negativi

Genul Veillonella

Diagnosticul de laborator al germenilor anaerobi endogeni, nesporulați implică o serie de etape specifice, întrucât acești microorganismе necesită condiții stricte de anaerobioză și metode speciale de izolare și identificare.

Mai jos sunt principalele etape și tehnici utilizate:

1. Prelevarea și transportul probelor

Se face din zone sterile (abcese profunde, lichid peritoneal, pleural etc.), evitând contaminarea cu floră aerobă sau mixtă.

Proba se recoltează în medii de transport speciale pentru anaerobi (ex: mediu cu reducători chimici – thioglycolat, tuburi cu atmosferă anaerobă sau borcane vidate).

Este esențial un transport rapid și în condiții anaerobe.

2. Examinarea directă

Colorația Gram: germenii anaerobi nesporulați apar ca bacili sau cocobacili gram-negativi sau gram-pozitivi, în funcție de specie.

3. Cultivarea în medii anaerobe

Se folosesc medii speciale:

Schaedler agar, Brucella agar, KVLB (Kanamicină – Vancomicină – Laked Blood Agar) pentru selectivitate.

Medii îmbogățite cu sânge, vitamina K și hemină.

Incubarea se face în atmosferă anaerobă: borcane anaerobe, pungi speciale, camere anaerobe, sau generatoare de gaz.

Timpul de incubație: 48–72 de ore sau mai mult, unele specii fiind lente.

4. Identificarea germenilor

Teste biochimice clasice: fermentarea zaharurilor, producerea de acizi, enzime specifice (catalază, indol, lipază).

Sisteme comerciale rapide (ex: API 20A, RapID ANA, VITEK 2 anaerob).

Spectrometrie de masă (MALDI-TOF): metodă rapidă și precisă pentru identificarea speciilor anaerobe.

PCR și alte teste moleculare – pentru identificare directă din probă sau din cultură.

5. Antibiograma

Se folosesc metode specifice pentru anaerobi (E-test, microdiluții).

Anaerobii nesporulați sunt, în general, sensibili la metronidazol, clindamicină, dar pot apărea rezistențe.

Tabelul 8. Anaerobi sporulați vs. nesporulați

Caracteristică	Anaerobi sporulați	Anaerobi nesporulați
Genuri reprezentative	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i>
Sporulare	Formează spori	Nu formează spori
Morfologie la Gram	Bacili gram-pozitivi	Bacili gram-negativi (în majoritate)
Habitat	Tub digestiv, sol	Flora normală (intestin, gură, vagin)
Infecții comune	Tetanus, botulism, gangrenă gazoasă	Abcese, infecții intraabdominale, pelvine
Producție de toxine	Frecventă (toxine puternice)	Mai rară, dar unele specii au enzime
Rezistență la căldură/uscarea	Spori foarte rezistenți	Sensibili la condiții de mediu
Tratament de elecție	Metronidazol, penicilină + clindamicină	Metronidazol, carbapeneme, clindamicină

XVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE GERMENI DIN GENUL *MYCOBACTERIUM*

1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis este bacilul tuberculozei, o boală infecțioasă cu transmitere predominant aerogenă. Diagnosticul de laborator este esențial pentru confirmarea infecției și pentru monitorizarea tratamentului.

Metode diagnostice:

a) Examenul microscopic (colorația Ziehl-Neelsen)

Se utilizează pentru evidențierea bacililor acid-alcool-rezistenți (BAAR).

Proba clasică este sputa sau alte secreții/piese de biopsie. Bacilii tuberculoși apar roșii, pe un fond albastru.

Este o metodă rapidă și simplă, dar cu o sensibilitate moderată ce necesită un număr minim de bacili pentru a fi detectați (~10⁴/ml).

b) Culturi bacteriene

Considerate standardul de aur în diagnosticul tuberculozei.

Se pot face pe medii solide (Lowenstein-Jensen) sau medii lichide automate (MGIT).

Dezavantaj: timpul de creștere este lent (4-8 săptămâni).

Permite identificarea speciei și testarea sensibilității la antibiotice.

c) Testele moleculare (PCR, GeneXpert)

Detectează ADN-ul specific al *Mycobacterium tuberculosis*.

Rapiditate mare (ore, față de săptămâni în cultură).

Testul GeneXpert detectează și rezistența la rifampicină.

d) Testele imunologice

Testul tuberculinic (Mantoux): test cutanat care detectează răspunsul imun la PPD (proteine purificate).

Testele interferon-gamma release assays (IGRA): măsoară eliberarea de IFN- γ după expunerea la antigene specifice tuberculozei.

Acestea nu confirmă boala activă, ci doar expunerea sau infecția latentă.

2. *Mycobacterium leprae*

Mycobacterium leprae este agentul etiologic al leprei, o boală cronică cutanată și neurologică.

Metode diagnostice:

a) Examenul microscopic

Se efectuează frotiuri de leziuni cutanate sau biopsii.

Bacilii se colorează cu Ziehl-Neelsen pentru a identifica bacili acid-alcool-rezistenți.

Sensibilitatea este mai mică față de tuberculoză, deoarece bacilii nu cresc pe medii artificiale.

b) Biopsia și examen histopatologic

Evaluarea modificărilor tisulare și prezența bacililor în țesut.

Clasificarea leprei (paucibacilară vs. multibacilară) se bazează și pe numărul bacililor.

c) Metode moleculare (PCR)

Detectează ADN-ul *Mycobacterium leprae* în probe cutanate.

Oferă un diagnostic mai rapid și mai precis, mai ales în cazurile paucibacilare.

d) Teste serologice

Detectarea anticorpilor împotriva proteinelor bacilare, cum ar fi proteina PGL-1, folosit ca test suportiv, nu de rutină.

XVIII. TREPONEMA PALLIDUM.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI

Sifilisul este o boală infecțioasă cu transmitere sexuală produsă de *Treponema pallidum*, caracterizată prin mai multe stadii clinice (primar, secundar, latent și terțiar). Diagnosticul de laborator este important pentru confirmarea bolii, pentru stabilirea stadiului și monitorizarea tratamentului.

Genul *Treponema* – Prezentare generală

Apartin clasei *Spirochaetia*, ordinului *Spirochaetales*.

Sunt bacterii, gram-negative, cu formă spiralată și flageli periplasmici (endoflageli).

Se mișcă printr-un mecanism unic, datorită flagelilor localizați între peretele celular și membrana externă.

Sunt bacterii foarte fragile, care nu pot fi cultivate în medii artificiale standard.

Speciile patogene de *Treponema*

Grupul este cunoscut și sub numele de treponeme clasice, care cauzează treponematoze, împărțite în două categorii:

1. *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*

Agentul etiologic al sifilisului (transmisă sexual sau congenital).

2. *Treponema pallidum* subspecies *pertenue*

Cauzează framboesia.

Boală cronică a pielii și oaselor, non-venereală. Se transmite prin contact direct cu leziuni.

Afectează în special copiii din zonele tropicale (Africa, Asia, Pacific).

3. *Treponema pallidum* subspecies *endemicum*

Cauzează bejelul (sifilis endemic).

Se transmite non-sexual, prin contact apropiat sau ustensile contaminate.

Prevalent în regiuni aride (Orientul Mijlociu, Africa de Nord, zone din Asia).

Afectează cavitatea bucală, faringele, pielea și oasele.

4. *Treponema carateum*

Cauzează pinta – o boală cronică a pielii.

Se transmite prin contact direct cu leziuni infectate.

Prevalent în America Centrală și de Sud.

Nu afectează organele interne.

1. Diagnosticul direct

Detectarea directă a treponemelor în leziuni este utilă mai ales în stadiile incipiente ale bolii.

Microscopia în câmp întunecat (dark-field microscopy) permite vizualizarea spirochetelor din lichidul din leziunile primare (șancru) sau din leziunile secundare. Este rapidă și specifică, limitată la leziunile cu scurgeri active și este puțin utilizată în practica curentă.

Teste moleculare (PCR):

Detectează ADN-ul bacterian în lichide biologice sau țesuturi, fiind foarte sensibilă și specifică.

2. Diagnosticul serologic

Este metoda principală și cea mai utilizată pentru diagnosticarea sifilisului.

Există două categorii principale de teste serologice:

a) Teste ne-treponemice (non-specific):

Detectează anticorpii care reacționează cu lipidele eliberate în timpul distrugerii celulare, nu direct împotriva *Treponemei*.

VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)

RPR (Rapid Plasma Reagin)

Sunt utile pentru screening și monitorizarea răspunsului la tratament (titru anticorpilor scade după tratament eficient).

Pot da rezultate fals pozitive în unele condiții (sarcină, lupus, alte infecții).

b) Teste treponemice (specifice):

Detectează anticorpi direcționați împotriva antigenelor specifice *Treponema pallidum*.

FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption)

TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination Assay)

EIA (Enzyme Immunoassay)

Sunt utilizate pentru confirmarea diagnosticului după testele nontreponemice.

Rămân pozitive pe viață, deci nu pot fi folosite pentru monitorizarea tratamentului.

Tablelul 9. Teste serologice utilizate pentru diagnosticarea sifilisului

Criteriu	VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)	RPR (Rapid Plasma Reagin)
Tip test	Nontreponemic	Nontreponemic
Ce detectează	Anticorpi anticardiolipinici (reagine)	Anticorpi anticardiolipinici (reagine)
Principiu imunologic	Reacție de floculare între antigen (cardiolipină + lecitină + colesterol) și anticorpi	Reacție de floculare vizibilă datorită particulelor de carbon atașate antigenului
Tip antigen	Cardiolipină + lecitină + colesterol fără colorant / particule	Cardiolipină + lecitină + colesterol + particule de carbon coloidal
Necesitatea microscopului	DA – citire la microscop (10×)	NU – se citește cu ochiul liber
Mediu de lucru	Lamă specială VDRL cu cercuri marcate	Card (cardboard plasticat) sau placă neagră RPR
Tip probă	Ser + LCR (foarte important pentru neurosifilis)	Ser sau plasmă (NU LCR)
Pregătire probă	Necesită inactivare complement 56°C / 30 min în unele protocoale	Nu necesită inactivare complement
Volum probă	Mic, precis standardizat	Mic, dar mai tolerant
Procedură	Antigen picurat + ser → agitare 4 min → microscop	Antigen picurat + ser → agitare 8 min → citire vizuală
Sensibilitate sifilis primar	Bună, dar puțin mai scăzută decât RPR	Ușor mai mare decât VDRL
Sensibilitate sifilis secundar	Foarte mare	Foarte mare

Criteriu	VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)	RPR (Rapid Plasma Reagin)
Sensibilitate sifilis latent	Scade	Scade
Specificitate	Similară, dar ușor dependentă de operator	Similară
Posibilitate fals negative	Precoce, târziu, fenomen prozonă	La fel
Posibilitate fals pozitive	Sarcină, boli autoimune, infecții virale, vârstă	La fel
Rapiditate	Moderată	Rapidă
Citire rezultat	Subiectivă, necesită experiență și microscop	Mai ușor de interpretat, vizual
Rezultat calitativ	Negativ / slab pozitiv / pozitiv / intens pozitiv	Negativ / pozitiv cu grad vizibil
Rezultat cantitativ (titru)	Da, prin diluții succesive (1:2, 1:4, 1:8 etc.)	Da, prin diluții succesive
Monitorizare tratament	Foarte bun	Foarte bun (mai des folosit clinic)
Util pentru screening populațional	Mai puțin utilizat	Test preferat pentru screening
Util în laborator clinic modern	Mai rar, mai mult pentru LCR și unele centre clasice	Cel mai utilizat în practica curentă
Util în neurosifilis	DA (test standard în LCR)	NU
Cost	Ușor mai mic	Ușor mai mare
Echipament necesar	Microscop + agitator	Doar agitator
Reproducibilitate	Bună dar operator-dependentă	Mai reproductibilă clinic
Stabilitate antigen	Mai redusă, necesită condiții stricte	Mai stabil
Standardizare internațională	Clasică, OMS istoric	Mai frecvent utilizată global în prezent
Raport vizualizare	Flocule albe fine	Puncte / granule negre pe fundal deschis

3. Algoritm de diagnostic uzual

Se face inițial un test ne-treponemic (RPR sau VDRL) pentru screening.

Dacă testul este pozitiv, se confirmă cu un test treponemic (FTA-ABS sau TPHA).

În unele laboratoare, se pornește cu testul treponemic și se confirmă cu test ne-treponemic, inversând algoritmul.

4. Teste suplimentare

Testarea HIV și alte ITS, deoarece co-infecția este frecventă.

Analize imagistice sau alte investigații în caz de afectare sistemică (ex. neurosifilis).

Cultivarea și colorabilitatea treponemelor

Treponema pallidum, este o bacterie extrem de exigentă din punct de vedere nutrițional și metabolic, ceea ce face imposibilă cultivarea sa pe medii artificiale obișnuite de laborator. Din acest motiv, diagnosticul sifilisului nu se bazează pe metode de cultură bacteriană, ci pe tehnici indirecte, precum serologia sau microscopie specială.

Totuși, în scopuri de cercetare, *Treponema pallidum* poate fi menținută în vivo, prin inoculare în testiculul iepurelui. Mai recent, au fost dezvoltate și metode experimentale de cultivare in vitro, folosind linii celulare și medii speciale, dar acestea nu sunt utilizate în practica medicală de rutină.

În ceea ce privește colorarea, treponemele nu se colorează eficient cu metoda Gram, din cauza dimensiunilor extrem de reduse și a structurii lor spiralate subțiri. Prin urmare, se folosesc metode speciale de evidențiere.

Una dintre cele mai eficiente tehnici este impregnarea cu argint (colorația Warthin-Starry), utilizată mai ales în histopatologie, unde

treponemele apar sub forma unor fire spiralate negre pe un fundal galben-maron.

O altă metodă foarte valoroasă este microscopia în câmp întunecat, care permite observarea bacteriilor vii din leziunile cutanate sau genitale. În această tehnică, treponemele apar ca filamente albe strălucitoare, în mișcare activă, pe un fundal negru.

De asemenea, se utilizează și tehnici de imunofluorescență, care presupun utilizarea de anticorpi marcați fluorescent specifici pentru *Treponema pallidum*. Acești anticorpi se leagă de bacterie și permit vizualizarea clară a spirochetelor sub microscop cu lumină ultravioletă.

Din cauza imposibilității cultivării *Treponema pallidum* pe medii artificiale, colorarea și observarea sa necesită metode speciale, precum microscopia în câmp întunecat, impregnarea argentică și imunofluorescența.

XIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL *LEPTOSPIRA*

Leptospirele aparțin genului *Leptospira*, din familia *Leptospiraceae*, fiind spirochete subțiri, spiralate, foarte mobile, cu capetele caracteristic în formă de cârlig. Din punct de vedere al patogenității, ele se clasifică în leptospire patogene, reprezentate în principal de *Leptospira interrogans*, care produc boala la om și animale, și leptospire saprofite, precum *Leptospira biflexa*, care trăiesc în mediul extern și nu produc infecție. Serologic, leptospirele se împart în numeroase serogrupuri și serotipuri, peste 250 fiind patogene, dintre cele mai importante fiind *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona* și *Grippotyphosa*.

Semnificația medicală și epidemiologică a leptospirelor este majoră, deoarece ele determină o zoonoză importantă – leptospiroza. Rezervorul principal este reprezentat de rozătoare, în special șobolanii, dar și de câini, bovine, porci și animale sălbatice. Bacteriile sunt eliminate prin urină și pot contamina apa, solul și alimentele. Infecția la om se produce prin pătrunderea bacteriei prin pielea lezată sau prin mucoase, fiind frecvent întâlnită la persoane expuse profesional, precum agricultori, veterinari, muncitori la canalizare, dar și în contexte de inundații sau înot în ape contaminate.

Manifestările clinice ale leptospirozei apar după o perioadă de incubație de aproximativ 7–12 zile și evoluează de obicei în două faze. Faza inițială, numită leptospiremică, debutează brusc cu febră înaltă, frisoane, cefalee intensă, mialgii marcate – mai ales la nivelul gambelor – fotofobie, vărsături și conjunctivită. Ulterior urmează faza imună, în care boala poate avea o formă ușoară, anicterică, asemănătoare unei viroze, uneori cu meningită aseptică, sau o formă severă, cunoscută ca boala Weil. În această formă gravă

apar icter intens, insuficiență hepatică și renală, manifestări hemoragice, tulburări cardiovasculare și respiratorii, putând surveni șocul și chiar decesul.

1. Diagnosticul de laborator al leptospirozei

Diagnosticul de laborator al leptospirozei se bazează pe metode bacteriologice (directe), serologice (indirecte) și clasic, pe reproducerea bolii experimentale. Metodele bacteriologice urmăresc evidențierea directă a leptospirelor în produsele patologice sau izolarea lor pe medii de cultură speciale, în timp ce metodele serologice detectează anticorpii specifici produși de organism. Boala experimentală reprezintă o metodă veche, folosită mai ales în scop științific, dar care are valoare teoretică importantă.

Diagnosticul bacteriologic

Diagnosticul bacteriologic este cel mai valoros în faza precoce a bolii, atunci când leptospirele circulă în sânge. În primele 7–10 zile de boală se recoltează sânge pentru hemocultură și, în cazurile complicate neurologice, se recoltează lichid cefalorahidian. După aproximativ a doua săptămână de evoluție, bacteriile dispar din sânge și se localizează la nivelul rinichiului, motiv pentru care diagnosticul se bazează pe examinarea urinei, unde leptospirele se pot elimina timp îndelungat.

Evidențierea directă se poate realiza prin examinare microscopică în câmp întunecat, unde pot fi observate leptospirele vii, subțiri, spiralate, foarte mobile, cu capetele în cârlig. În anumite situații se pot utiliza metode de colorare specială precum colorările argentinice sau imunofluorescența, deoarece colorarea Gram nu este utilă. Deși metoda este rapidă, ea necesită un laborator bine dotat și personal experimentat.

Izolarea bacteriologică prin cultură este metoda clasică de confirmare. Pentru creștere se folosesc medii speciale precum Fletcher, EMJH, Korthof sau

Stuart, deoarece leptospirele sunt bacterii foarte exigente. Cultura necesită condiții aerobe stricte, temperatură optimă 28–30°C și perioade lungi de incubare, care pot varia între 1 și 6 săptămâni, uneori chiar mai mult. Coloniile nu se văd cu ochiul liber, de aceea culturile sunt examinate periodic la microscop în câmp întunecat. Deși foarte specifică, această metodă este dificilă, lentă și nu este disponibilă în toate laboratoarele.

Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este metoda cea mai utilizată în prezent, fiind deosebit de util după prima săptămână de boală, când organismul începe să producă anticorpi. Anticorpii de tip IgM apar, de regulă, după 5–7 zile de boală și indică infecția recentă, iar anticorpii IgG apar mai târziu și persistă mai mult timp.

Testul standard de aur pentru diagnosticul leptospirozei este testul de aglutinare microscopică (MAT). Acest test utilizează culturi vii reprezentative pentru diferite serogrupuri de *Leptospira*, care sunt amestecate cu serul pacientului în diluții succesive. Dacă serul conține anticorpi specifici, apare aglutinarea leptospirelor, care poate fi observată la microscop. Un titru considerat semnificativ sau creșterea de cel puțin patru ori între două probe recoltate la interval de 7–10 zile confirmă diagnosticul. Testul MAT are avantajul unei specificități foarte ridicate și permite orientarea către serogrupul implicat, însă necesită laboratoare specializate și personal bine instruit.

Pe lângă MAT, în practica curentă sunt utilizate teste ELISA pentru detectarea anticorpilor IgM și IgG, deoarece sunt mai rapide, mai accesibile și mai ușor de interpretat. De asemenea, există teste de aglutinare pe latex, hemaglutinare indirectă și teste rapide imunocromatografice, utile în screening. Limitările metodelor serologice sunt reprezentate de faptul că în primele zile ale bolii testele pot fi negative, iar anticorpii pot persista o perioadă îndelungată, îngreunând diferențierea între infecția recentă și cea veche.

Diagnosticul prin boala experimentală

Diagnosticul prin boala experimentală reprezintă o metodă clasică, astăzi rar utilizată în practica curentă, dar foarte importantă din punct de vedere teoretic. Principiul constă în inocularea materialului patologic suspect (sânge, LCR sau urină) la animale de laborator sensibile, în special cobai sau hamsteri. Dacă materialul conține leptospire, animalul dezvoltă după câteva zile semne de boală, uneori chiar moarte. Ulterior, din organele animalului (ficat, rinichi, sânge) se pot evidenția leptospirele prin microscopie sau cultură, confirmând diagnosticul. Din motive etice și datorită apariției metodelor moderne precum PCR, această metodă este rezervată centrelor de cercetare.

Tabelul 10. Clasificarea metodelor de diagnostic

Tip diagnostic	Ce urmărește	Când este util	Materiale	Metode	Avantaje	Limitări
Bacteriologic direct	Evidențierea leptospirelor	Faza precoce (sânge/ LCR), tardivă (urină)	Sânge, LCR, urină	Microscopie câmp întunecat, colorări speciale, cultură pe medii speciale	Confirmare directă, specificitate mare	Sensibilitate variabilă, tehnică dificilă, cultură foarte lentă
Serologic	Detectarea anticorpilor	După 5–7 zile de boală	Ser	MAT, ELISA, teste rapide	Metodă principală actuală, mai rapidă și accesibilă	Poate fi negativ precoce, reacții încrucișate, anticorpi persistenți
Boala experimentală	Confirmare prin reproducerea bolii	Rareori, laboratoare speciale	Material patologic inoculat la animale	Inoculare la cobai / hamster și verificare ulterioară	Foarte sigură teoretic	

XX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL *BORRELIA*

Genul *Borrelia*

1. Generalități

Genul *Borrelia* aparține familiei *Spirochaetaceae* și cuprinde bacterii de tip spirochetă. Acestea sunt bacterii subțiri, spiralate, cu un număr redus de spire largi și foarte mobile datorită flagelilor periplasmici, numiți endoflageli. Structural, sunt Gram-negative, dar colorarea Gram este dificilă, iar vizualizarea lor este optimă prin microscopie în câmp întunecat, colorări argentice sau imunofluorescență. Bacteriile din genul *Borrelia* sunt microaerofile sau anaerobe facultative și nu se dezvoltă pe medii bacteriene obișnuite, necesitând medii speciale sau sisteme de cultură complexe. Ele se transmit în principal prin artropode hematofage, în special căpușe și păduchi, ceea ce explică caracterul lor zoonotic și endemic.

2. Clasificare

Genul *Borrelia* se împarte în două grupuri principale cu importanță medicală. Primul grup cuprinde speciile responsabile de **boala Lyme**, denumită și borrelioza Lyme. Printre cele mai importante specii se numără *Borrelia burgdorferi*, regăsită cu preponderență în America de Nord, *Borrelia afzelii* frecvent asociată cu manifestări cutanate în Europa, și *Borrelia garinii*, asociată mai ales cu manifestări neurologice în Europa. Aceste bacterii sunt transmise prin căpușe *Ixodes*. Al doilea grup include speciile responsabile de **febra recidivantă**, care determină episoade febrile recurente și se transmit prin păduchi sau căpușe moi de tip *Ornithodoros*. Speciile implicate sunt *Borrelia recurrentis* pentru febra recidivantă epidemică și *Borrelia hermsii*, *Borrelia*

duttonii sau *Borrelia parkeri* pentru formele endemice. Infecțiile produse de aceste bacterii sunt caracterizate prin episoade febrile intermitente datorită variației antigenice.

3. Importanță clinică

Boala Lyme este cea mai frecventă infecție transmisă prin căpușe în Europa și America de Nord și evoluează în mai multe stadii. În stadiul I, localizat precoce, se manifestă prin eritem migrator, o leziune cutanată în formă de țintă, asociat cu febră, astenie și cefalee. În stadiul II, diseminat, pot apărea complicații neurologice, precum meningită aseptică sau paralizie facială, complicații cardiace, inclusiv miocardită și tulburări de conducere, precum și artralgie și artrite migratorii. În stadiul III, tardiv, boala poate evolua către artrita Lyme cronică, neuroborrelioză cronică și acrodermatită atrofică cronică, aceasta fiind mai frecvent asociată cu *Borrelia afzelii*.

Febra recidivantă se caracterizează prin episoade de febră foarte înaltă, transpirații abundente, cefalee și mialgii, urmate de perioade afebrile. Recurența febrilor se datorează variației antigenice. Forma epidemică, transmisă prin păduchi, este de obicei mai severă decât forma endemică, transmisă prin căpușe.

Diagnosticul de laborator al Boreliozei

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Borrelia* se bazează pe metode bacteriologice directe, serologice, moleculare și experimentale, fiecare având rol specific în confirmarea infecției, determinarea speciei și evaluarea riscului epidemiologic. Alegerea metodei depinde de faza bolii, de materialul biologic disponibil și de resursele laboratorului.

4.1. Diagnosticul bacteriologic direct și examinarea vectorilor

Diagnosticul bacteriologic direct se realizează prin detectarea spirochetelor în materialele biologice recoltate de la pacient, cum ar fi sângele, lichidul cefalorahidian, urina sau biopsiile pielii din zonele afectate. În stadiile precoce, *Borrelia* circulă în sânge, ceea ce permite identificarea lor prin **microscopie în câmp întunecat**, unde spirochetele apar ca bacterii spiralate, subțiri, foarte mobile, cu capete caracteristice în formă de cârlig. Pentru creșterea sensibilității, se pot folosi colorări speciale argintice sau imunofluorescență directă. Culturile bacteriologice se realizează pe medii speciale, cum ar fi BSK II, care oferă nutrienții și condițiile microaerofile necesare multiplicării *Borreliei*. Cultura permite confirmarea certă a diagnosticului, dar este dificilă, consumatoare de timp și sensibilă la contaminare.

O componentă importantă a diagnosticului bacteriologic este **examinarea vectorilor**. Căpușele și păduchii colectați din medii endemice pot fi examinați direct prin microscopie în câmp întunecat sau colorări speciale pentru detectarea spirochetelor. Determinarea prezenței *Borreliei* în artropodele vectori permite evaluarea riscului epidemiologic, identificarea speciilor implicate și studiul răspândirii geostatice a bolii. Detectarea spirochetelor în vectori este folosită și în programe de supraveghere a bolilor transmisibile prin căpușe și păduchi, fiind un element esențial pentru prevenție și control.

4.2. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este metoda cea mai frecvent utilizată pentru boala Lyme și detectează anticorpi specifici împotriva *Borreliei* în serul pacientului. Anticorpii de tip IgM apar de obicei în prima săptămână și indică infecția recentă, în timp ce anticorpii IgG apar mai târziu și persistă pentru perioade îndelungate. Testele standard includ ELISA pentru screening, urmat

de Western Blot sau imunofluorescență indirectă pentru confirmarea diagnosticului și identificarea proteinelor specifice. Limitările serologiei constau în faptul că anticorpii pot lipsi în primele zile de boală, rezultând teste negative, și pot apărea reacții încrucișate cu alte spirochete.

4.3. Metode moleculare

Tehnicile moleculare, în special PCR, permit detectarea ADN-ului *Borrelie* în sânge, lichid cefalorahidian, piele sau vectori. PCR este extrem de sensibilă și utilă în fazele precoce ale infecției, când anticorpii nu sunt încă detectabili. Aceasta permite diagnostic rapid, identificarea speciilor și evaluarea încărcăturii bacteriene. Testele moleculare pot fi aplicate și pentru examinarea căpușelor și păduchilor, pentru a confirma prezența *Borrelie* și a monitoriza distribuția vectorilor.

4.4. Modele experimentale

Modelele experimentale implică inocularea materialului biologic suspect sau a extractelor de vector în animale sensibile, cum ar fi cobai sau hamsteri. Această metodă permite reproducerea bolii și izolarea spirochetelor din organele animalului pentru studii bacteriologice și patogenetice. Modelele experimentale sunt folosite în principal în cercetare și laboratoare de referință, fiind rar utilizate în practica clinică datorită cerințelor etice și a existenței metodelor moderne mai rapide.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Borrelia* necesită combinarea mai multor metode complementare pentru a obține o confirmare precisă a infecției și pentru a evalua stadiul bolii. În ansamblu, o abordare integrată, care combină metode bacteriologice, serologice, moleculare și analiza vectorilor, asigură cel mai complet și fiabil diagnostic al infecțiilor cu *Borrelia* și sprijină atât managementul clinic, cât și supravegherea epidemiologică.

XXI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE MICOPLASME

Micoplasme

1. Generalități

Micoplasmele reprezintă un grup de bacterii foarte mici, lipsite de perete celular, ceea ce le conferă o flexibilitate extremă și le face rezistente la antibioticele care acționează asupra peretelui bacterian, precum penicilinele și cefalosporinele. Ele aparțin clasei *Mollicutes* și sunt cele mai mici bacterii capabile de replicare independentă, având dimensiuni între 0,2 și 0,3 micrometri. Structura lor flexibilă le permite să adopte forme variate, adesea ameboide, iar membrana lor celulară conține steroli, care conferă stabilitate mecanică și funcționează similar peretelui celular. Micoplasmele sunt bacterii aerobice sau microaerofile, cu metabolism foarte simplu, și se dezvoltă lent pe medii speciale bogate în nutrienți, precum medii cu extract de carne, ser și steroli. Ele sunt microorganisme **parazitare sau oportuniste**, colonizând tractul respirator, tractul urogenital și, în anumite condiții, sângele sau articulațiile.

2. Clasificare

Genul *Mycoplasma* include mai multe specii cu relevanță medicală. Cele mai importante pentru om sunt:

- *Mycoplasma pneumoniae*, responsabilă pentru pneumonii atipice, infecții respiratorii și exacerbare a bolilor cronice pulmonare.
- *Mycoplasma genitalium*, implicată în uretrite non-gonococice și infecții ale tractului genital feminin.
- *Mycoplasma hominis*, frecvent asociată cu infecții genito-urinare, complicații obstetricale și infecții sistemice la pacienții imunocompromiși.

- ***Ureaplasma urealyticum*** și ***Ureaplasma parvum***, responsabile de uretrite, vaginite și complicații perinatale.

Speciile diferă prin tropismul tisular, potențialul patogen și capacitatea de a provoca boli acute sau cronice.

3. Importanță clinică

Micoplasmele sunt responsabile pentru o gamă largă de afecțiuni clinice. *Mycoplasma pneumoniae* determină pneumonie atipică, caracterizată prin debut lent, tuse persistentă, febră moderată și infiltrate pulmonare difuze. Infecția poate fi asociată cu manifestări extrapulmonare, cum ar fi afectarea sistemului nervos, hemoliză și artrite.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* și *Ureaplasma spp.* provoacă infecții genito-urinare, incluzând uretrite, vaginite, boală inflamatorie pelvină și complicații obstetricale, cum ar fi avort spontan sau naștere prematură. Aceste microorganisme pot fi implicate și în infecții sistemice la pacienții imunocompromiși, inclusiv bacteriemii și endocardite.

Datorită lipsei peretelui celular, tratamentul infecțiilor cu micoplasme se bazează pe antibiotice care acționează asupra sintezei proteice sau ADN, cum sunt **tetraciclinele**, **macrolidele** și **fluorochinolonele**, iar eficiența poate fi influențată de apariția rezistenței bacteriene.

4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu micoplasme

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea micoplasmelor din probe biologice și monitorizarea dinamicii titrului de anticorpi specifici în ser. În funcție de localizarea infecției, se recoltează exudat faringian, spută, secreții nazale, secreții vaginale sau uretrale, urină și alte produse biologice. Recoltarea trebuie realizată cu strictă respectare a normelor de sterilitate, iar însămânțarea produsului pe medii de cultură trebuie să fie

imediată. Dacă însămânțarea nu este posibilă imediat, se utilizează medii de transport complexe. Pentru *Ureaplasma urealyticum*, se recomandă tamponane de dacron, alginat sau poliester, deoarece alte materiale pot inhiba creșterea bacteriei.

Examenul microscopic direct se efectuează numai dacă există posibilitatea de a evidenția micoplasmele prin imunofluorescență cu anticorpi monoclonali antimicoplasma.

Izolarea și cultivarea

Produsele biologice se însămânțează pe medii speciale lichide, solide sau difazice, care conțin bulion Martin, extract de drojdie, ser sanguin și factori selectivi precum penicilină, albastru de metilen sau uree pentru *Ureaplasma urealyticum*. Cultivarea necesită condiții speciale de temperatură, pH și umiditate.

Culturile lichide nu devin întotdeauna tulburi decât în cazul unei creșteri abundente. Culturile solide se examinează la intervale de 2-3 zile, timp de 2-3 săptămâni, la microscop cu lumină oblică, datorită dimensiunilor mici ale coloniilor, cuprinse între 10-20 μm și 600 μm. Coloniile sunt rotunde, cu centru dens și zonă periferică mai clară, aspect numit “ochi de ou”. Micoplasmele pot fi cultivate și pe culturi celulare sau ouă embrionate.

Identificarea

Examenul morfologic nu permite identificarea exactă a speciilor, deoarece forma micoplasmelor este variabilă și depinde de condițiile de cultivare. Micoplasmele pot fi cocoide, filamentoase, cu structuri terminale, în formă de pară sau stelate. Orientarea se face prin caracteristicile metabolice, cum ar fi metabolizarea glucozei de către *M. pneumoniae*, a argininei de către *M. hominis* sau hidroliza ureei de către *Ureaplasma urealyticum*. *M. pneumoniae* reduce albastrul de metilen, caracter specific speciei.

Pentru identificarea rapidă și testarea sensibilității la antibiotice, se folosesc kituri care combină cultura în bulion selectiv cu stripuri ce conțin substraturi specifice și indicator de culoare. Citirea rezultatelor se face la 24 și 48 de ore și permite identificarea speciei, evaluarea semicantitativă și testarea sensibilității la antibiotice.

Diagnosticul molecular și serologic

Detectarea rapidă a *M. pneumoniae* direct din probele patologice se poate realiza prin PCR, cu sensibilitate crescută la spută, dar mai scăzută la exudatul faringian. Diagnosticul serologic este utilizat în principal pentru infecțiile cu *M. pneumoniae*. Reacția de fixare a complementului evidențiază IgG, care ating titru maxim la 4 săptămâni de la debut și persistă 6-12 luni. Testul ELISA este mai sensibil și specific, evidențiind IgM care indică infecția acută. De asemenea, evidențierea aglutinelor “la rece” permite detectarea IgM nespecifice care aglutinează hematiile la 4°C.

Sensibilitate la antibiotice

Datorită lipsei peretelui celular, micoplasmele sunt rezistente la antibioticele care acționează asupra acestuia. Tratamentul se face cu tetraciline sau eritromicină, antibioticul de alegere fiind claritromicina. *Ureaplasma urealyticum* este rezistentă la tetraciclină, iar *M. hominis* la eritromicină și uneori la tetraciclină. Doxiciclina are eficiență scăzută, în timp ce azitromicina administrată în doză unică are rată de vindecare crescută. Noile macrolide și quinolone, precum azitromicina sau moxifloxacina, sunt utilizate frecvent și asigură un tratament eficient și rapid.

XXII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE GENUL *RICKETTSIA*

1. Generalități

Rickettsiile sunt bacterii obligat intracelulare, aparținând familiei *Rickettsiaceae*, cu dimensiuni mici, între 0,3 și 0,5 micrometri, cu formă rotundă sau ovală. Ele nu pot supraviețui sau multiplica în afara celulelor gazdă și sunt strict dependente de metabolismul acestora. *Rickettsiile* sunt transmise în principal prin artropode hematofage, cum sunt căpușele, păduchii și puricii. Aceste bacterii cauzează boli febrile acute cu afectare vasculară, caracterizate prin febră, erupții cutanate și afectare multiorganică. Ele se multiplică în celulele endoteliale, provocând leziuni ale vaselor sanguine și manifestări clinice severe.

2. Clasificare

Genul *Rickettsia* se împarte în mai multe grupuri principale în funcție de caracteristicile antigenice și tipul bolii pe care o determină.

Cele mai importante sunt:

- **Grupul *Rickettsia Spotted Fever* (SFR)**, care include specii precum *Rickettsia rickettsii*, responsabilă de febra Rocky Mountain, și *Rickettsia conorii*, responsabilă de febra botoniformă mediteraneană. Aceste specii sunt transmise prin căpușe și provoacă febră, cefalee, erupții cutanate maculo-papulare și afectare multiorganică.
- **Grupul *Rickettsia Typhus***, care include specii precum *Rickettsia prowazekii*, responsabilă de tifosul epidemic, transmis prin păduchi, și *Rickettsia typhi*, responsabilă de tifosul murin, transmis prin purici.

Infecțiile determină febră, cefalee, erupții cutanate și, în forme severe, insuficiență multiorganică.

- **Grupul *Orientia***, care include *Orientia tsutsugamushi*, agentul scrufulozei japoneze sau febrei trombiculare, transmis prin larvele de acarieni.

3. Importanță clinică

Rickettsiile determină boli sistemice acute, cu debut brusc, febră mare, cefalee intensă, mialgii și, frecvent, erupții cutanate. Manifestările clinice depind de specie și grup: febra Rocky Mountain se caracterizează prin febră, cefalee și erupții maculo-papulare ce apar în centrul corpului și se extind periferic; febra botoniformă mediteraneană are debut brusc cu febră, dureri musculare și erupții cutanate, iar în punctul de inoculare apare adesea un eschar negru caracteristic; tifosul epidemic și tifosul murin determină febră, cefalee și erupții maculare sau maculo-papulare, iar boala poate fi severă în lipsa tratamentului.

Rickettsiile pot afecta multiple organe, provocând vasculită sistemică, necroză endotelială, afectare hepatică, pulmonară și renală. Complicațiile pot include șoc, insuficiență multiorganică și deces în formele severe netratate.

4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Rickettsia*

4.1. Recoltare și examinare microscopică

Recoltarea probelor biologice se face în funcție de stadiul bolii și de manifestările clinice. Cele mai frecvent utilizate probe sunt sângele periferic, biopsiile cutanate din zonele cu erupții sau eschar și lichidele corporale în cazuri severe. Examinarea microscopică directă este limitată de faptul că *rickettsiile* sunt bacterii obligat intracelulare și devin vizibile doar în celulele gazdă. Detectarea lor se realizează prin **imunofluorescență directă** cu

anticorpi specifici, colorări speciale sau microscopie electronică. Această metodă permite evidențierea *rickettsiilor* în celulele endoteliale și în țesuturile afectate, însă sensibilitatea este limitată și rezultatele trebuie completate de metode serologice sau moleculare.

4.2. Izolarea și identificarea

Rickettsiile sunt bacterii obligat intracelulare, deci nu pot fi cultivate pe medii bacteriene standard. Izolarea lor se realizează în laboratoare de referință, pe linii celulare sensibile, embrioni de găină sau culturi celulare specializate. Multiplicarea în celulele gazdă permite observarea morfologiei bacteriilor și confirmarea diagnosticului. Această metodă este consumatoare de timp, necesită condiții speciale de siguranță biologică și este utilizată mai ales pentru cercetare, studii epidemiologice și izolarea tulpinilor pentru teste suplimentare.

4.3. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este metoda cea mai frecvent utilizată pentru confirmarea infecțiilor rickettsiale și se bazează pe detectarea anticorpilor IgM și IgG împotriva *Rickettsia*. Standardul de aur este imunofluorescența indirectă (IFA), care permite detectarea anticorpilor acut-recente (IgM) și a anticorpilor IgG care apar mai târziu și pot persista luni sau ani. Alte teste serologice includ ELISA și teste de aglutinare.

Reacții clasice

Reacția Weil-Felix se bazează pe fenomenul de reacție încrucișată între anticorpii anti-rickettsiali și antigeni somatici ai unor tulpini de *Proteus* (OX19, OX2, OXK). Aceasta permite detectarea indirectă a infecției, fiind rapidă și accesibilă, însă are specificitate redusă și poate da rezultate fals pozitive.

Reacția Kódicke utilizează antigene rickettsiale mai purificate și urmărește aglutinarea anticorpilor, fiind mai specifică decât Weil-Felix, dar mai rar utilizată în practica curentă, fiind înlocuită de metode serologice moderne și tehnici moleculare.

4.4. Metode moleculare

Tehnicile moleculare, în special **PCR**, permit detectarea ADN-ului rickettsial în sânge sau țesuturi, oferind un diagnostic rapid și specific, mai ales în faza acută a bolii înainte de apariția anticorpilor. PCR permite identificarea rapidă a speciei, confirmarea diagnosticului și monitorizarea epidemiologică a infecțiilor rickettsiale.

XXIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

1. Generalități

Chlamydia trachomatis este o bacterie **intracelulară obligatorie**, aparținând clasei *Chlamydiia*, familia *Chlamydiaceae*. Aceasta are dimensiuni mici (0,2–0,4 micrometri) și prezintă un ciclu de viață particular, cu două forme morfologice distincte: corpul elementar (elementary body), forma infecțioasă și rezistentă, care pătrunde în celulele gazdă, și corpul reticulat (reticulate body), forma metabolică activă, care se multiplică în interiorul celulei gazdă.

C. trachomatis este agentul etiologic al mai multor infecții la om, incluzând **bolile urogenitale, conjunctivitele neonatale și adulte**, precum și **trachomul**, o boală oculară endemică în anumite regiuni ale lumii. Infecțiile pot fi **asimptomatice în proporție mare** (până la 70% la femei și 50% la bărbați), ceea ce favorizează transmiterea silențioasă și complicațiile pe termen lung.

2. Clasificare

Chlamydia trachomatis este împărțită în **serotipuri** în funcție de antigenii de pe membrana externă și tabloul clinic asociat:

- **Serotipuri A, B, Ba, C** – responsabile de **trachom**
- **Serotipuri D–K** – implicate în **infecțiile urogenitale și conjunctivite neonatale**
- **Serotipuri L1, L2, L3** – determină **limfgranulomul venerian (LGV)**

Această clasificare este importantă pentru ghidarea tratamentului și pentru supravegherea epidemiologică.

3. Importanță clinică

Infecțiile cu *C. trachomatis* se manifestă diferit în funcție de serotip:

- **Infecții urogenitale (D–K):** la femei pot provoca cervicită, vaginită, boală inflamatorie pelvină, infertilitate și sarcină ectopică; la bărbați determină uretrite nongonococice, epididimite și prostatite
- **Conjunctivite:** la nou-născuți apar ca conjunctivite neonatale, în primele săptămâni de viață, prin transmitere verticală; la adulți pot fi conjunctivite cronice sau acute
- **Trachom (A–C):** boală oculară cronică care poate duce la cicatrizarea conjunctivei și orbire în forme severe
- **Linfogranulomul venerian (L1–L3):** boală sistemică, caracterizată prin limfadenopatie inghinală și complicații inflamatorii locale

4. Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Chlamydia trachomatis*

Diagnosticul de laborator se bazează pe evidențierea directă a agentului etiologic în produsele biologice, pe metode de cultură, pe teste serologice și în special pe metode moleculare, care reprezintă standardul actual.

4.1. Recoltarea și transportul probelor

Tipul de probă depinde de localizarea infecției. Pentru infecțiile urogenitale se recoltează secreții cervico-vaginale la femei și secreții uretrale sau prima porțiune de urină la bărbați. În cazul conjunctivitelor se recoltează secreții conjunctivale, iar în limfogranulomul venerian se poate recolta conținut ganglionar sau aspirat din leziuni. Recoltarea se face în condiții stricte de sterilitate, iar probele trebuie transportate rapid în medii speciale care mențin viabilitatea chlamydiilor, deoarece acestea sunt germeni intracelulari fragili.

4.2. Examenul microscopic

Examinarea microscopică directă permite orientarea diagnosticului. Frotiurile pot fi colorate Giemsa, unde se pot evidenția incluziuni intracitoplasmatică caracteristice în celulele epiteliale. Metoda cu imunofluorescență directă, utilizând anticorpi monoclonali specifici anti-*Chlamydia trachomatis*, permite identificarea corpurilor elementare în celule și are sensibilitate și specificitate superioare colorării clasice. Totuși, aceste metode sunt considerate orientative și necesită confirmare prin alte tehnici.

4.3. Izolarea și identificarea prin cultură

Cultura reprezintă metoda clasică de diagnostic și se realizează numai în laboratoare specializate, deoarece *Chlamydia trachomatis* este bacterie intracelulară obligatorie. Izolarea se face pe linii celulare sensibile, cum sunt celulele McCoy sau HeLa, unde bacteria pătrunde și se multiplică sub formă de corpuri reticulate, care ulterior formează incluziuni intracelulare vizibile la microscop prin colorări speciale sau imunofluorescență. Această metodă confirmă cert diagnosticul, dar este laborioasă, costisitoare și necesită timp.

4.4. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic se bazează pe detectarea anticorpilor specifici în serul pacienților. Anticorpul IgM apar în faza acută și indică infecția recentă, iar IgG apar mai târziu și pot persista o perioadă îndelungată. Metodele utilizate includ reacția ELISA și imunofluorescența indirectă. Serologia este utilă mai ales în formele sistemice, în limfogranulomul venerian și în evaluarea complicațiilor cronice, dar are valoare mai mică în infecțiile acute urogenitale deoarece anticorpul pot apărea tardiv.

4.5. Metode moleculare

Metodele de biologie moleculară reprezintă standardul actual de diagnostic. Testele de amplificare a acizilor nucleici, în special PCR, permit detectarea ADN-ului *Chlamydia trachomatis* direct din secreții urogenitale, urină, secreții conjunctivale sau probe ganglionare. PCR are sensibilitate și specificitate foarte mare, detectează infecțiile asimptomatice, încărcăturile bacteriene mici și permite identificarea rapidă și precisă a infecției, chiar înaintea apariției anticorpilor. Unele teste pot evidenția și serotipurile implicate, fiind utile epidemiologic.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Chlamydia trachomatis* se bazează pe corelarea clinică cu rezultatele de laborator. Examenul microscopic și cultura pe linii celulare contribuie la confirmarea directă a infecției, serologia are utilitate selectivă, iar metodele moleculare PCR reprezintă metoda de elecție datorită rapidității, sensibilității și specificității foarte ridicate.

XXIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE VIRUSURI

Clasificarea virusurilor

1. Ribovirusuri (Virusuri ARN)

Familia *Picornaviridae*

Genuri:

- *Enterovirus* (virusurile polio, Coxsackie, ECHO)
- *Cardiovirus* (virusul encefalomiocarditei)
- *Rhinovirus* (agenții guturaiului)
- *Aphthovirus* (virusurile febrei aftoase)
- *Heparnavirus* (virusul hepatitei A)

Caracteristici: virusuri fără anvelopă, diametru 27-30 nm, capsidă cu simetrie icosaedrică, genom ARN monocatenar (ss) cu polaritate pozitivă, infecțios.

Familia *Caliciviridae*

Virusuri fără anvelopă, cu simetrie icosaedrică, diametru 35-40 nm
Exemple: coronavirusuri, astrovirusuri, agentul Norwalk.

Familia *Togaviridae*

Genuri:

- Alfavirus* (virusurile encefalitelor ecvine de vest, est și Venezuela)
- Rubivirus* (virusul rubeolic)
- Hepacivirus* (virusul hepatitei C)
- Pestivirus* (virusul diareei bovine)

Caracteristici: virusuri anvelopate, diametru 60-70 nm, simetrie icosaedrică, genom ARN ss cu polaritate pozitivă, infecțios.

Familia *Flaviviridae*

Reprezentanți: virusurile febrei galbene, Denga, encefalitei ruse de primăvară-vară.

Familia *Arteriviridae*

Reprezentant: virusul arteritei ecvine.

Familia *Bunyaviridae*

Reprezentanți: virusul encefalitei de California, virusul febrei hemoragice de Crimeea.

Familia *Orthomyxoviridae*

Include virusurile gripale (Influenzavirus A, B, C)

Caracteristici: virusuri anvelopate, simetrie helicoidală, diametru 80-120 nm, genom ARN ss segmentat cu polaritate negativă.

Familia *Paramyxoviridae*

Genuri:

Morbillivirus (virusul rujeolic)

Pneumovirus (virusul respirator sincițial)

Paramixovirus (paramixovirusuri și virusul urlian)

Caracteristici: virusuri cu diametru 100-150 nm, genom ARN ss nesegmentat, stabil antigenic.

Familia *Rhabdoviridae*

Reprezentant: virusul rabic

Caracteristici: virusuri anvelopate, simetrie helicoidală, genom ARN ss nesegmentat cu polaritate negativă.

Familia *Filoviridae*

Include virusurile *Marburg* și *Ebola*, cauzatoare de febre hemoragice.

Familia *Coronaviridae*

Virusuri cu genom ARN ss cu polaritate pozitivă.

Familia *Reoviridae*

Genuri:

Reovirus – virusuri cu tropism respirator și intestinal

Orbivirus – virusuri encefalitogene

Rotavirus – virusuri cauzatoare de gastroenterite la nou-născuți și copii mici.

Familia *Retroviridae*

Subfamili:

Oncovirinae – virusuri oncogene ARN (ex.: HTLV-1, HTLV-2)

Lentivirinae – agenți ai bolilor degenerative ale SNC și HIV

Spumavirinae – virusuri ce provoacă infecții cronice, asimptomatice

Caracteristici: simetrie icosaedrică, genom ARN ss în două copii identice, prezența enzimei reverstranscriptază.

2. Deoxiribovirusuri (Virusuri ADN)

Familia *Parvoviridae*

Virusuri mici (18-26 nm), fără anvelopă, genom ADN ss.

Infectează celulele stem hematopoietice, determinând boli hematologice.

Familia *Papovaviridae*

Subfamili:

Polymixovirinae – implicată în formarea tumorilor cu localizări multiple

Papillomavirinae – cauzează veruci și papiloame cutanate

Caracteristici: virusuri fără anvelopă, diametru 40-50 nm, capsidă icosaedrică, genom ADN dublu-catenar (ds) circular.

Familia *Adenoviridae*

Agenți virali cu tropism adeno-faringo-conjunctival

Caracteristici: virusuri fără anvelopă, diametru 65-85 nm, capsidă icoaedrică, genom ADN ds circularizat.

Familia *Hepadnaviridae*

Reprezentant: virusul hepatitei B

Caracteristici: virusuri cu tropism hepatic, diametru 42 nm, genom parțial ds, aproape circular.

Familia *Herpesviridae*

Include 8 reprezentanți cu importanță medicală:

Virusurile *herpes simplex* tip 1 și 2 (HSV-1, HSV-2)

Virusul *citomegalic* (CMV sau HHV-3)

Virusul *varicelo-zosterian* (HHV-4)

Virusul *Epstein-Barr* (HHV-5)

HHV-6, HHV-7, HHV-8

Caracteristici: virusuri anvelopate, diametru 120-300 nm, capsidă icoaedrică, genom ADN ds liniar.

Familia *Poxviridae*

Include:

Virusul vaccinia

Virusul variolic

Virusul *Molluscum contagiosum*

Agenții Orf (*parvaccinia*)

Caracteristici: virusuri mari (200-350 nm), anvelopate, formă paralelipipedică.

Diagnosticarea infecțiilor virale în patologia umană se realizează printr-un set de metode complementare:

- **Teste serologice** pentru detectarea și monitorizarea răspunsului imun (IgM, IgG) – utile în stabilirea infecțiilor acute sau a celor anterioare.
- **Tehnici moleculare (PCR/RT-PCR)**, care oferă o sensibilitate și specificitate ridicată, fiind indispensabile pentru detectarea directă a materialului viral în diverse probe clinice.
- **Cultura virală și izolarea în linii celulare**, folosite în laboratoarele de referință pentru studii epidemiologice și pentru caracterizarea detaliată a tulpinilor virale.
- **Teste rapide (antigen)**, care, deși au o sensibilitate mai scăzută, sunt valoroase pentru screening în contexte epidemice.

Caracteristici generale și diagnostic de laborator

Familia *Poxviridae*

Familia *Poxviridae* include mai multe genuri, dintre care cele mai relevante pentru patologia umană sunt:

- **Genul *Orthopoxvirus***, ce cuprinde:
 - Virusul variolic (*Variola major* și *Variola minor*);
 - Virusul vaccinal (utilizat în vaccinarea antivariolică);
 - Virusul variolei maimuțelor (*Monkeypox*);
 - Virusul variolei vacilor (*Cowpox*), care se transmite ocazional la om.
- **Genul *Molluscipoxvirus***, reprezentat de *Molluscum contagiosum*, responsabil de leziuni cutanate benigne la om.

Genul *Orthopoxvirus*

Virusul variolic

Morfologie și structură

- este unul dintre cele mai mari virusuri (aprox. 300x170 nm),
- are formă paralelipipedică sau ovoidală,
- genom ADN bicatenar circular, protejat de un nucleoid central și o anvelopă lipoproteică complexă.

Patogeneză

- variola a fost eradicată la nivel global în 1980 prin vaccinare,
- infecția se transmite prin aerosoli, cu multiplicare inițială la nivelul căilor respiratorii și a ganglionilor limfatici,
- ulterior, virusul se răspândește prin sânge (*viremie primară și secundară*), determinând o infecție sistemică ce afectează pielea și mucoasele,
- simptomele apar după 10-12 zile și includ febră, urmată de o erupție cutanată progresivă: macule → papule → vezicule → pustule → cruste. Vindecarea lasă cicatrici persistente.
- există două forme clinice:
 - *Variola major* – mortalitate >30%.
 - *Variola minor* (alastrim) – formă mai ușoară, mortalitate <1%.

Virusul vaccinal

- folosit în vaccinarea antivariolică datorită reactivității antigenice comune cu virusul variolic.

Virusul variolei vacilor (*Cowpox*)

- se transmite de la bovine la om, provocând leziuni cutanate limitate la locul contactului (mâini, brațe), fără răspândire sistemică.

Genul *Molluscipoxvirus*

Virusul *Molluscum contagiosum*

- afectează doar omul, producând leziuni nodulare caracteristice la nivelul pielii, mai ales pe trunchi,
- leziunile devin ombilicate și conțin corpusculi specifici (*corpusculi molluscum*), unde se găsesc virioni,
- se transmite prin contact direct cu pielea afectată sau prin contact sexual.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul infecțiilor poxvirale se bazează pe metode directe și indirecte:

Examinare microscopică

- colorația cu Giemsa sau Mason-Trichrom poate evidenția incluziuni citoplasmatică specifice (corpuri Guarnieri în variolă sau *Corpusculi molluscum* în *Molluscum contagiosum*),
- microscopie electronica, vizualizarea directă a virionilor.

Culturi celulare

- virusurile *Orthopoxvirus* pot fi cultivate pe linii celulare (*Vero*, *BHK*, *HeLa*), dar *Molluscum contagiosum* nu se dezvoltă pe culturi clasice.
- efect citopatic, formarea de celule mari, multinucleate.

Detectarea ADN viral (PCR)

- testul PCR este metoda de referință pentru identificarea specifică a virusului,
- permite diferențierea *Orthopoxvirus* de alte infecții virale.

Serologie (ELISA, imunofluorescență)

- folosită pentru identificarea anticorpilor anti-variolic sau pentru confirmarea expunerii la *Orthopoxvirus*.
- nu este utilă pentru *Molluscum contagiosum*.

Teste imunohistochimice

- detectarea antigenului viral în secțiuni de piele prin tehnici de imunohistochimie sau imunofluorescență.

Familia *Adenoviridae*

Adenoviridae include virusuri implicate în infecții respiratorii, gastrointestinale și oculare, grupate în cinci genuri. La om, cel mai important este genul *Mastadenovirus*, care cuprinde șase grupe clasificate după tropism:

- Grupa A (*tipurile 12, 18, 31*) – afectează tractul gastrointestinal;
- Grupa B (*tipurile 3, 7, 11, 16, 21, 34, 35*) – infecții respiratorii, genito-urinare și conjunctivale;
- Grupa C (*tipurile 1, 2, 5, 6*) – infecții faringiene;
- Grupa D (*tipurile 8, 9, 19, 22, 23, 30, 44, 47*) – infecții respiratorii, oculare și genito-urinare;
- Grupa E (*tipul 4*) – infecții respiratorii superioare și conjunctivite;
- Grupa F (*tipurile 40, 41*) – enterite virale.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni, 70-90 nm, fără anvelopă,
- genom, ADN dublu catenar, liniar.
- capsidă icosaedrică, foarte stabilă în mediu extern,
- variabilitate genetică ridicată → permite recombinarea între serotipuri, generând noi tulpini cu potențial epidemic și severitate variabilă.

Patogeneză și mecanism de transmitere

- adenovirusurile infectează epiteliul respirator, digestiv și ocular, pătrunzând prin aerosoli, contact direct sau ingestie de apă contaminată (ex. piscine),
- după replicare la nivelul porții de intrare, virusul se răspândește prin contiguitate, limfatic și sanguin (viremie), afectând diverse organe,

- la pacienții imunodeprimați pot apărea infecții severe și generalizate,
- infecția poate persista latent în țesuturile limfoide (amigdale, vegetații adenoide), reactivându-se în condiții de imunosupresie.

Sindroame clinice

- febra faringo-conjunctivală (*tipurile 3, 7, 14*)
 - faringită + conjunctivită + febră,
 - se transmite prin apa contaminată (ex. piscine);
- infecții respiratorii acute (*tipurile 4, 7*)
 - răceli, pneumonii virale severe (mai ales la copii),
 - bronșite, laringite, sindroame asemănătoare tusei convulsive;
- conjunctivite și keratoconjunctivită epidemică (*tipurile 8, 19, 37*)
 - inflamație oculară severă, uneori epidemică,
 - apare în urma expunerii la corpi străini oculari sau iritații;
- gastroenterite (*tipurile 40, 41, 31, 2*)
 - diaree severă la copii, fiind a doua cauză de enterită virală după rotavirusuri;
- infecții uro-genitale (*tipurile 11, 21, 14, 15*)
 - cistite hemoragice autolimitante,
 - uretrite la bărbați, cervicite la femei, cu posibile complicații renale;
- infecții ale sistemului nervos (*tipurile 3, 5, 6, 7, 12, 32*)
 - meningoencefalite rare, dar potențial severe;
- infecții generalizate (la pacienți imunodeprimați)
 - pneumonii, hepatite, afectare multiorganică cu risc letal.

Răspuns imun

- imunitatea umorală
 - anticorpi anti-antigen de grup (persistă până la 1 an).
 - anticorpi anti-antigen specific de tip (persistență mai lungă).
- imunitatea celulară, esențială în controlul infecției.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul direct

- PCR (reacția de polimerizare în lanț) → metoda de referință pentru detectarea genomului adenoviral,
- microscopie electronică → evidențiază particulele virale în materiile biologice,
- izolarea virusului în culturi celulare (*linii HeLa, A549, Vero*).

Diagnosticul serologic

- ELISA → detectează anticorpii specifici,
- reacția de fixare a complementului (RFC) → evidențiază anticorpii de grup,
- seroneutralizare → identifică tipul specific de adenovirus,
- hemaglutinoinhibare → determină prezența anticorpilor neutralizanți.

Profilaxie și prevenire

- nu există vaccin de uz general,
- în SUA, vaccinuri orale vii atenuate (tipurile 4 și 7) sunt utilizate în unități militare,
- măsuri de igienă, spălarea mâinilor, dezinfectarea suprafețelor, evitarea contactului cu secreții infectate.

Familia *Herpesviridae*

Familia *Herpesviridae* cuprinde peste 100 de virusuri, dintre care 8 afectează omul, fiind împărțite în trei subfamilii:

- ***Alphaherpesvirinae*** – infecții acute, persistente cu latență în ganglionii nervoși:
 - *Herpes simplex virus* tip 1 (HSV-1)
 - *Herpes simplex virus* tip 2 (HSV-2)
 - *Virusul varicelo-zosterian* (VZV)
- ***Betaherpesvirinae*** – infecții cu replicare lentă și latență în celule mononucleare:
 - *Cytomegalovirus* (CMV)
 - *Virusul herpetic uman tip 6* (HHV-6)
 - *Virusul herpetic uman tip 7* (HHV-7)
- ***Gammaherpesvirinae*** – virusuri cu tropism limfocitar, unele implicate în oncogeneză:
 - *Virusul Epstein-Barr* (EBV)
 - *Virusul herpetic uman tip 8* (HHV-8) – asociat sarcomului Kaposi

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni, 180-200 nm, formă sferică,
- genom, ADN dublu catenar, liniar, înconjurat de capsidă icosaedrică,
- prezintă anvelopă lipidică, cu proiecții glicoproteice esențiale pentru infecție și imunitate.

Subfamilia *Alphaherpesvirinae*

Virusul *Herpes Simplex* (HSV-1 și HSV-2)

- HSV-1 – afectează predominant zona oro-facială,
- HSV-2 – implicat în infecțiile genitale și neonatale.

Manifestări clinice

- infecție primară – primul contact cu virusul, adesea asimptomatic sau cu leziuni veziculare dureroase,
- infecție recurentă – reactivare periodică din ganglionii senzitivi,
- complicații severe – encefalită herpetică, keratoconjunctivită, herpes neonatal sever.

Virusul *Varicelo-Zosterian* (VZV)

- infecția primară → varicela (erupție polimorfă, febră, afectare sistemică ocazională),
- *reactivare* → zona zoster (erupție dermatomică dureroasă),
- complicații- encefalită, nevralgie post-herpetică, afectare oftalmică severă,
- vaccin disponibil pentru prevenirea infecției și reactivărilor.

Subfamilia *Betaherpesvirinae*

***Cytomegalovirus* (CMV)**

- infecție asimptomatică la adult, dar severă la nou-născuți și imunodeprimați,
- transmitere- transplacentară, sexuală, transfuzională, transplant,
- complicații- boala incluziilor citomegalice la nou-născuți, pneumonii, retinită și hepatită la pacienții imunocompromiși.

Subfamilia *Gammaherpesvirinae*

Virusul *Epstein-Barr* (EBV)

- responsabil de mononucleoza infecțioasă („boala sărutului”),
- legat de oncogeneza limfomului Burkitt și a carcinomului nazofaringian,
- transmitere prin salivă, contact direct.

Manifestări clinice

- mononucleoză infecțioasă → febră, faringită, adenopatii, hepatosplenomegalie,
- neoplazii asociate → limfom Burkitt, carcinom nazofaringian.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul direct

- PCR (reacția de polimerizare în lanț)
 - detectează ADN-ul viral în sânge, lichid cefalorahidian sau țesuturi,
 - util pentru HSV encefalită, CMV la nou-născuți, EBV în limfoame;
- culturi celulare (rar folosite)
 - HSV și CMV pot fi izolate pe linii celulare (fibroblaste umane),
 - aspecte citopatice specifice: celule gigant multinucleate pentru HSV și CMV;
- microscopie electronică
 - evidențiază virioni, dar nu este o metodă de diagnostic uzuală.

Diagnosticul serologic

- ELISA
 - detectează anticorpi specifici IgM (infecție acută) și IgG (infecție trecută),
 - util pentru CMV congenital, EBV mononucleoză, HSV seroconversie;
- testul Paul-Bunnell (mononucleoza infecțioasă)
 - identifică anticorpi heterofili, specifici EBV;
- reacția de fixare a complementului (RFC)
 - permite identificarea anticorpilor specifici de tip IgG;
- Western blot (imunoblotting)
 - confirmă prezența antigenelor virale la pacienții cu infecții cronice.

Examinări specifice

- citologia Tzanck
 - identifică celule gigante multinucleate în leziunile herpetice,
 - nu diferențiază HSV-1 de HSV-2;
- biopsie ganglionară sau tisulară;
 - identifică celule Reed-Sternberg-like în infecții EBV asociate limfoamelor;
- analize sanguine în mononucleoză
 - limfocitoză atipică cu hiperleucocitoză,
 - transaminaze crescute în caz de afectare hepatică.

Prevenire și profilaxie

- vaccinare- disponibilă pentru *Varicela-Zoster*, în curs de dezvoltare pentru CMV,

- măsuri generale- igiena riguroasă, utilizarea protecției în cazul HSV-2,
- monitorizare serologică la pacienții imunodeprimați și gravide expuse la CMV.

Familia *Papillomaviridae*

Familia *Papillomaviridae* include un singur gen, *Papillomavirus*, care infectează atât omul, cât și diverse animale. Virusurile din această familie sunt extrem de specifice pentru gazdă și afectează în principal epiteliul tegumentar și mucoas.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni mici, 45-55 nm, fără anvelopă,
- genom ADN dublu catenar, circular, protejat de o capsidă icosaedrică,
- induce proliferare celulară, putând duce fie la leziuni benigne, fie la transformare malignă.

Patogeneză și mecanism de transmitere

- transmitere prin contact direct cu leziuni infectate, contact sexual, transmitere verticală (de la mamă la nou-născut),
- virusul infectează stratul bazal al epiteliului, unde poate persista latent sau se poate replica activ în celulele diferențiate (keratinocite);
- evoluția infecției variază:
 - infecție asimptomatică sau benignă (veruci, condiloame),
 - infecție latentă, cu recurențe,
 - transformare malignă prin integrarea ADN-ului viral în genomul celulei gazdă.

Sindroame clinice

- veruci cutanate (negi) – afectează pielea palmară și plantară;
- papiloame bucale și laringiene – tumori benigne, dar potențial obstructive la copii,
- condiloame genitale (veruci genitale) – afectează organele genitale externe și zona perianală,
- leziuni displazice genitale – produse de HPV 16, 18, 31, 33, pot evolua spre neoplazie cervicală,
- neoplazia cervicală intraepitelială – stadiu precanceros, favorizat de cofactori precum fumatul sau infecții concomitente (*Chlamydia*, *Neisseria*, virusuri herpetice),
- boala Bowen – leziune precanceroasă tegumentară, cu risc de evoluție spre cancer cutanat,
- cancerul de col uterin – în peste 90% din cazuri este asociat cu infecția HPV.

Diagnostic de laborator

Biologie moleculară (metoda de elecție)

- PCR (reacția de polimerizare în lanț) – detectează ADN-ul HPV și identifică tipul viral (oncogen sau non-oncogen),
- hibridizare moleculară (Southern blot, dot blot, in situ hybridization) – permite determinarea integrării ADN-ului viral în genomul celulei gazdă,
- testul HPV-DNA – utilizat în screening-ul cancerului de col uterin, mai ales în combinație cu testul Papanicolau;

Examen citologic

- testul Papanicolau – evidențiază celule atipice (coilocite), indicând o posibilă infecție cu HPV;

Histopatologie

- biopsia leziunilor suspecte poate confirma dereglările celulare și prezența ADN-ului HPV;

Serologie

- detecția anticorpilor anti-HPV nu este utilizată pentru diagnostic, ci doar în cercetare epidemiologică;

Profilaxie și prevenție

- vaccinare – protejează împotriva tipurilor HPV cu risc oncogen (16, 18) și a celor cu condiloame genitale (6, 11),
- recomandată înaintea debutului vieții sexuale (11-12 ani), dar utilă și pentru adulți până la 26 de ani,
- igienă riguroasă, evitarea contactului cu leziuni infectate, utilizarea prezervativului pot reduce riscul de infecție, dar nu oferă protecție completă.

Familia *Polyomaviridae*

Inițial încadrate în *Papovaviridae*, polyomavirusurile au fost reclasificate într-o familie separată. Conform Comitetului Internațional de Taxonomie Virală (ICTV), familia *Polyomaviridae* este împărțită în trei genuri:

- *Orthopolyomavirus*
- *Wukipolyomavirus*
- *Avipolyomavirus*

Numeroase polyomavirusuri rămân neclasificate și sunt în curs de cercetare.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni mici, 45-55 nm, fără anvelopă,
- genom ADN dublu catenar, circular, superspiralat,

- capsidă icosaedrică,
- prezintă două regiuni funcționale:
 - regiunea precoce → codifică proteine T transformante (implicate în replicare și oncogeneză),
 - regiunea tardivă → codifică proteine capsidale VP1, VP2, VP3.

Patogeneză și mecanism de transmitere

- infecția primară este asimptomatică sau se manifestă ușor la nivel respirator sau urinar,
- virusurile au tropism limfocitar, putând rămâne latente în organe precum rinichii, plămânii și sistemul reticuloendotelial,
- la persoanele imunodeprimite, reactivarea infecției duce la replicare virală activă, cu eliminare de virioni în urină sau răspândire sistemică, afectând SNC.

Sindroame clinice

- infecția primară
 - de obicei asimptomatică,
 - poate provoca cistită ușoară sau simptome respiratorii minore;
- reactivarea infecției latente (la pacienți imunodeprimați)
 - cistită hemoragică – leziuni ale vezicii urinare cu eliminare de sânge în urină,
 - stenoză ureterală – îngustarea ureterelor cu risc de insuficiență renală,
 - leucoencefalopatia progresivă multifocală (PML) – afectare neurologică severă, cauzată de *Virusul JC*, care determină

- demielinizare cerebrală, ducând la tulburări motorii, de vorbire și vedere, cu risc letal,
- carcinom cu celule Merkel – asociat cu Merkel Cell *Polyomavirus* (MCV), un cancer tegumentar agresiv.

Diagnostic de laborator

Citologie urinară

- se analizează sedimentul urinar pentru celule epiteliale mari cu incluziuni bazofile intranucleare, asemănătoare celor observate în infecțiile cu *Cytomegalovirus* (CMV),
- este util în diagnosticarea infecțiilor urinare cu polyomavirusuri;

Biologie moleculară (metoda de elecție)

- PCR (reacția de polimerizare în lanț)
 - detectează ADN-ul viral în urină, sânge, LCR sau țesut cerebral,
 - utilă pentru *Virusul JC* (leucoencefalopatie), virusul BK (nefropatie asociată transplantului) și MCV (carcinom cu celule Merkel);
- hibridizare moleculară cu sonde ADN
 - permite identificarea directă a genomului viral în probe de țesut,
 - utilă pentru infecțiile cronice și monitorizarea pacienților imunocompromiși;

Examinare histologică și imunohistochimie

- pentru tumorile asociate polyomavirusurilor, se analizează biopsii tisulare,
- se utilizează markeri imunohistochimici pentru virusul JC (în SNC) și MCV (în carcinoame cutanate).

Familia *Orthomyxoviridae*

Familia *Orthomyxoviridae* cuprinde virusurile responsabile de gripă, o infecție virală cu caracter epidemic și pandemic. Include patru genuri:

- ***Influenzavirus A*** – cel mai virulent, afectează oameni și animale (ex. păsări, porci),
- ***Influenzavirus B*** – circulă exclusiv la om, provoacă epidemii mai restrânse,
- ***Influenzavirus C*** – determină forme ușoare de gripă,
- ***Thogotovirus*** – mai puțin studiat, include virusurile *Thogoto*, *Dhori* și *Batken*.

Caracteristici morfologice și genetice

- Dimensiuni, 100-200 nm, cu formă sferică sau filamentoasă,
- genom ARN monocatenar, segmentat (7-8 segmente, polaritate negativă),
- anvelopă lipoproteică, derivată din membrana celulei gazdă, cu spiculi de hemaglutinină (HA) și neuraminidază (N),
- capsidă helicoidală, ce conține proteina M (matrix),
- enzime asociate genomului: polimeraze (PB1, PB2, PA) și proteine nestructurale (NS1, NS2, BM2).

Variabilitate antigenică și impact epidemiologic

Virusurile gripale prezintă o rată crescută de mutație, ceea ce favorizează apariția de noi tulpini:

- deriva antigenică (Antigenic drift)
 - mutații punctiforme progresive în HA și N, ducând la epidemii sezoniere;
- schimbare antigenică majoră (Antigenic shift)
 - recombinare între tulpini umane și animale, rezultând noi subtipuri pandemice (ex. *H1N1*, *H5N1*).

Patogeneză și mod de transmitere

- transmitere aeriană, prin aerosoli sau contact direct cu secreții infectate,
- virusul se multiplică în epiteliul respirator, distrugând ciliile și afectând mecanismele locale de apărare,
- infecțiile severe pot cauza pneumonii virale sau suprainfecții bacteriene (*S. aureus*, *H. influenzae*, *Streptococcus hemolyticus*).

Manifestări clinice – gripa

- incubație: 2-5 zile,
- simptome principale:
 - febră mare (peste 39-40°C), frisoane,
 - cefalee, mialgii, artralгии, stare de epuizare,
 - tuse seacă, rinoree, faringită;
- evoluție autolimitantă (1-2 săptămâni), dar forme severe apar la:
 - copii mici, vârstnici, imunocompromiși, persoane cu boli cronice,
 - posibile complicații: pneumonie gripală, miocardită, sindrom Guillain-Barré.

Diagnostic de laborator

Diagnostic molecular (metoda de elecție)

- RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
 - detectează ARN viral în secreții nazofaringiene sau sânge,
 - Real-time RT-PCR este metoda standard pentru identificarea subtipurilor virale (H/N);

Serologie

- ELISA, hemaglutinoinhibare, seroneutralizare – detectează anticorpi specifici anti-NP și anti-H,
- fixarea complementului – mai puțin utilizată, relevă anticorpi post-infecție;

Izolarea virusului

- se realizează prin culturi celulare (MDCK, Vero) sau inoculare pe ouă embrionate,
- nu este utilizată în diagnosticul rapid, dar ajută la caracterizarea epidemiologică a tulpinilor circulante.

Profilaxie și prevenire

Vaccinare antigripală

- vaccinuri inactivate trivalente sau tetravalente
 - conțin antigene de suprafață ale tulpinilor circulante (H1N1, H3N2, B/Victoria, B/Yamagata),
 - se actualizează anual conform recomandărilor OMS;
- vaccinuri vii atenuate – încă în studii clinic,
- vaccinuri recombinante – în dezvoltare, pe bază de proteine virale purificate.

Administrare:

- copii <8 ani, nevaccinați anterior → 2 doze (0,5 ml, la 30 de zile)
- adulți și copii >8 ani → 1 doză (0,5 ml, intramuscular).
- grupe de risc prioritare:
 - vârstnici peste 65 de ani,
 - copii instituționalizați,
 - persoane cu boli cronice cardio-pulmonare, diabet,
 - personal medical, profesori, funcționari publici.

Familia *Paramyxoviridae*

Familia *Paramyxoviridae* include virusuri care afectează atât omul, cât și animalele. Se împarte în două subfamilii:

Subfamilia *Paramyxovirinae*

- *Genul Respirivirus*: virusurile paragripale umane tip 1 și 3.
- *Genul Rubulavirus*: virusurile paragripale 2 și 4, virusul urlian (*oreion*).
- *Genul Morbillivirus*: virusul rujeolic.

Subfamilia *Pneumovirinae*

- *Genul Pneumovirus*: virusul sincițial respirator (RSV).
- *Genul Metapneumovirus*: virusuri aviare.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni mari, 150-300 nm, formă sferică sau filamentoasă,
- genom ARN monocatenar, polaritate negative,
- anvelopă lipoproteică, cu spiculi glicoproteici (ex. hemaglutinină-neuraminidază (HN), hemaglutinină (H) sau proteina G),
- capsidă helicoidală.

Virusurile paragripale (tip 1, 2, 3, 4)

Patogeneză și manifestări clinice

- transmitere aeriană, infecții respiratorii endemo-epidemice,
- se replică în tractul respirator superior, cauzând faringită, laringită, bronșită,
- la sugari și copii mici pot duce la bronșiolită și pneumonie,
- imunitatea este de scurtă durată, astfel încât reinfecțiile sunt frecvente.

Diagnostic de Laborator

- Serologie (detectie anticorpi specifici IgM, IgG):

- hemaglutinoinhibare (HAI),
- fixarea complementului (RFC),
- ELISA, RIA
- RT-PCR pentru detecția ARN viral (cea mai sensibilă metodă).

Virusul urlian (Oreionul)

Patogeneză și manifestări clinice

- infecție prin secreții respiratorii,
- după viremie, afectează parotidele (parotidita urliană), testiculele (orhita), pancreasul, ovarele și SNC (meningită urliană),
- poate cauza sterilitate în cazul orhitei bilaterale.

Diagnostic de laborator

- Serologie
 - IgM anti-urlian prin ELISA sau fixarea complementului;
- RT-PCR pentru detecția ARN viral în salivă, urină sau LCR.

Profilaxie

- Vaccin trivalent (ROR): administrare la 12 luni și rapel la 5 ani.

Virusul rujeolic (Pojarul)

Patogeneză și manifestări clinice

- infecție foarte contagioasă, transmisă aerian,
- se răspândește în ganglionii limfatici, apoi determină viremie și infectează organele limfoide, plămânii, pielea, ochii și intestinal,
- erupție maculo-papuloasă după 3-4 zile de febră, catar oculo-nazal și tuse,
- complicații: encefalită, pneumonie cu celule gigante, panencefalită sclerozantă subacută (la 2-10 ani post-infecție).

Diagnostic de laborator

- Examen direct
 - identificarea celulelor gigante multinucleate din secrețiile nazale,
 - imunofluorescență pentru antigene virale;
- Serologie
 - creștere de 4 ori a titrului IgG prin:
 - hemaglutinoinhibare,
 - fixarea complementului,
 - ELISA, RIA;
- RT-PCR pentru confirmarea rapidă a infecției.

Profilaxie

- Vaccin ROR la 12 luni și rapel la 5 ani.

Virusul sincițial respirator (RSV)

Patogeneză și manifestări clinice

- cauza principală a infecțiilor respiratorii la sugari și copii mici,
- determină bronșiolită necrozantă, colaps pulmonar și pneumonii interstițiale,
- la imunodeprimați poate provoca infecții persistente severe.

Diagnostic de laborator

- RT-PCR pentru ARN viral (cea mai sensibilă metodă),
- ELISA sau imunofluorescență pentru detectarea antigenelor virale.

Familia *Picornaviridae*

Virusurile din familia *Picornaviridae* sunt responsabile de infecții digestive, respiratorii și nervoase la om și animale. Cele mai importante genuri implicate în patologia umană sunt:

Genul *Enterovirus* – afectează tractul digestiv, respirator și sistemul nervos:

- *Virusul poliomieltic* (tipurile 1, 2, 3),
- *Virusurile Cocksackie* (grup A și B),
- *Virusurile ECHO*,
- *Enterovirusurile 68-71*;

Genul *Rhinovirus* – infecții ale tractului respirator superior (*115 serotipuri*);

Genul *Hepatovirus* – include virusul hepatitic A (tratat separat).

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni mici, 27-30 nm, fără anvelopă,
- capsidă icosaedrică, formată din 4 proteine structurale (VP1-VP4),
- genom ARN monocatenar, polaritate pozitivă → permite replicare rapidă.

Genul *Enterovirus*

Virusul poliomieltic

Patogeneză și manifestări clinice

- transmitere fecal-orală, replicare inițială în țesutul limfoid faringian și intestinal,
- după viremie, invadează SNC, afectând coarnele anterioare ale măduvei spinării, ducând la paralizii flasce,
- forme clinice:

- infecție asimptomatică,
- simptome ușoare (pseudo-gripale),
- fază meningitică → paralizii motorii;
- poate afecta și nervii cranieni (poliomielita bulbară), cu risc de paralizie respiratorie și deces.

Diagnostic de laborator

- Serologie (seruri perechi)
 - reacția de seroneutralizare,
 - fixarea complementului,
 - ELISA pentru detectarea IgM și IgG specific;
- Biologie moleculară
 - PCR pentru detectarea ARN viral din sânge, LCR sau materiile fecale.

Profilaxie

- vaccin inactivat (Salk, VPI) – administrare injectabilă,
- vaccin viu atenuat (Sabin, VPOT) – administrare orală.
- **Program de vaccinare în România:**
 - 3 doze VPI (2, 4, 11 luni),
 - revaccinare la 6 ani (VPI + DTPa);
- OMS vizează eradicarea poliomielitei prin supraveghere epidemiologică strictă.

Virusurile *Coxsackie*

Patogeneză și manifestări clinice

- transmitere respiratorie și digestive,
- infecții cu localizări diverse, în funcție de serotip:
 - herpangina – febră, disfagie, vezicule pe amigdale și palat,

- boala "gură, mână, picior" – vezicule pe mucoasa bucală, mâini, picioare,
- pleurodinia (boala Bornholm) – dureri toracice, febră, afectare pleurală,
- miocardită – poate fi fatală la nou-născuți,
- meningită virală, hepatită, pancreatită.

Diagnostic de laborator

- Serologie
 - seroneutralizare, fixarea complementului,
 - ELISA pentru IgM și IgG;
- PCR pentru detectarea ARN viral în sânge, LCR, secreții faringiene.

Virusurile *ECHO*

Manifestări clinice

- meningită aseptică, miocardită (tipurile 4, 6, 11, 22),
- infecții respiratorii, enterite estivale (tipurile 8, 11, 18, 19),
- paralizii faciale, pleurodinie, conjunctivite.

Diagnostic de Laborator

- serologie (*seruri perechi*, seroneutralizare, ELISA),
- RT-PCR din materii fecale, sânge, LCR.

Alte *Enterovirusuri* (Tipurile 68-71)

Manifestări clinice

- *Enterovirus 70* – conjunctivită hemoragică acută,
- *Enterovirus 71* – boala " gură, mână, picior ", meningoencefalite.

Diagnostic de laborator

- PCR pentru ARN viral din secreții respiratorii, sânge, LCR.

Genul *Rhinovirus*

Patogeneză și manifestări clinice

- 115 serotipuri, responsabile de răceala comună ("common cold"),
- infecția rămâne localizată la nivelul tractului respirator superior,
- simptome: rinoree, congestie nazală, tuse, dureri faringiene.

Diagnostic de Laborator

- RT-PCR pentru identificarea ARN viral,
- izolarea virusului din secrețiile nazale pe culturi celulare.

Familia *Rhabdoviridae*

Familia *Rhabdoviridae* include virusuri cu tropism neurotrop, afectând omul și animalele. Cele mai relevante genuri sunt:

Genul *Lyssavirus* – virusul rabic (rabia/turbarea).

Genul *Vesiculovirus* – virusul stomatitei veziculare (afecțiune rară la om).

Virusul rabic (rabia/turbarea)

Caracteristici morfologice și genetice

- formă unică, asemănătoare unui glonț, dimensiuni 70-80 nm x 120-240 nm,
- anvelopă lipidică, cu glicoproteine de suprafață (G) → permit atașarea la celule gazdă.
- capsidă helicoidală,
- genom ARN monocatenar, polaritate negativă.

Patogeneză și transmitere

- se transmite prin mușcătura animalelor infectate (câini, vulpi, lilieci, lupi, pisici),

- incubanție variabilă (10 zile – 1 an), în funcție de localizarea mușcăturii și gradul infectării,
- se multiplică inițial local, apoi migrează prin nervii periferici spre SNC, provocând encefalită rabică,
- după replicare în creier, virusul se răspândește centrifug spre glande salivare, mucoase și alte țesuturi.

Simptome și evoluție

- fază prodromală- febră, anxietate, disconfort la locul mușcăturii,
- fază neurologică:
 - hiperexcitabilitate, convulsii, spasm faringian (hidrofobie),
 - paralizii progresive → afectare respiratorie → evoluție letală.

Diagnostic de laborator

Examen direct

- detectare antigenică (metode rapide, recomandate ante-mortem):
 - imunofluorescență directă din salivă, LCR, piele occipitală (biopsie cutanată),
 - ELISA – detectează antigenul viral din secreții;
- detectare post-mortem:
 - examen histologic cerebral → identificare corpusculi Babeș-Negri (inclusiuni citoplasmatică specifice din neuroni);

Biologie moleculară (metoda de elecție)

- RT-PCR – identifică ARN-ul viral din LCR, salivă, țesut nervos;

Serologie (evaluare răspuns imun post-vaccinal sau post-expunere)

- ELISA → detectare anticorpi anti-G,
- teste de seroneutralizare → evaluare anticorpi protectori în sânge și LCR.

Profilaxie și tratament

Profilaxie post-expunere

- curățarea rapidă și riguroasă a plăgii cu apă și săpun + dezinfectanți,
- administrare imunoglobulină specifică (RIG) – neutralizare virală imediată,
- vaccin antirabic inactivat → administrare în schema 0, 3, 7, 14, 28 zile (5 doze).

Profilaxie pre-expunere pentru grupe de risc

- personal veterinar, speologi, lucrători în laboratoare de virusologie → vaccinare preventivă (3 doze).

Familia *Coronaviridae*

Coronaviridae include virusuri ce afectează atât oamenii, cât și animalele. Se împart în trei grupuri principale:

- *Alfa-coronavirusuri*
- *Beta-coronavirusuri* (*SARS-CoV*, *MERS-CoV*, *SARS-CoV-2*)
- *Gamma-coronavirusuri*

În decembrie 2019, în Wuhan (China), a fost identificat un nou coronavirus (SARS-CoV-2), agentul cauzal al COVID-19, declarată pandemie globală de OMS în martie 2020.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni, 75-160 nm, formă sferică sau ovoidală,
- anvelopă lipidică cu spiculi glicoproteici, asemănătoare unei „coroane” (de unde și denumirea),
- genom ARN monocatenar, polaritate pozitivă → permite replicare rapidă în celula gazdă,

- proteine structurale principale:
 - proteina S (Spike) – permite atașarea la receptorii ACE2 ai celulelor gazdă,
 - proteina N – interacționează cu ARN-ul viral,
 - proteinele M și E – stabilizare și asamblare virală.

Patogeneză și mod de transmitere

- transmitere direct, prin picături respiratorii de la persoanele infectate,
- transmitere indirectă, prin atingerea suprafețelor contaminate, apoi contact cu gura, nasul sau ochii,
- perioada de incubație: 2-14 zile,
- virusul afectează tractul respirator superior și inferior, provocând distrugerea epiteliului ciliat,
- forme clinice:
 - infecții asimptomatice,
 - simptome ușoare (febră, tuse, oboseală),
 - forme severe (pneumonie, insuficiență respiratorie, sindrom de detresă respiratorie acută – SDRA),
 - complicații: tromboembolism, afectare cardiacă, insuficiență multiplă de organ.

Diagnostic de laborator

Biologie moleculară

- RT-PCR (reacția de polimerizare în lanț cu transcripție inversă)
 - detectează ARN viral în exudat nazofaringian, spută, LCR sau probe de țesut pulmonar,
 - cele mai utilizate ținte genetice: genele ORF1ab, N, S și E,
 - sensibilitate ridicată → confirmare rapidă a infecției active;

Teste serologice (detectia anticorpilor specifici)

- ELISA, chemiluminescenta (CLIA), imunocromatografie
 - detecteaza anticorpi IgM, IgG, IgA,
 - IgM apare in primele 7-10 zile post-infectie,
 - IgG persista mai multe luni,
 - util in studii epidemiologice, dar nu in diagnostic precoce;

Teste rapide antigenice

- detecteaza proteina virală N din secretiile nazofaringiene,
- mai rapide decat PCR, dar mai puțin sensibile;

Culturi celulare și microscopie electronica

- se foloseste doar in cercetare, nu in diagnostic clinic.

Tratament și profilaxie

- tratament simptomatic și de susținere → oxigenoterapie, ventilatie mecanică in cazurile severe;
- medicamente antivirale aprobate:
 - Remdesivir – inhibitor al ARN-polimerazei virale,
 - Molnupiravir, Paxlovid – antivirale orale utilizate in formele moderate,
 - corticosteroizi (ex. dexametazonă) – pentru forme severe cu inflamatie excesivă;
- vaccinare preventivă:
 - vaccinuri ARNm (Pfizer, Moderna),
 - accinuri vectorizate (AstraZeneca, Johnson & Johnson),
 - vaccinuri inactivate (Sinopharm, Sinovac).

Familia *Reoviridae*

Familia *Reoviridae* include virusuri ce cauzează infecții respiratorii, gastrointestinale și sistemice la om. Cele mai relevante genuri sunt:

Genul *Reovirus (Orthoreovirus)*

Genul *Rotavirus* – agent principal al gastroenteritelor la copii mici.

Genul *Orbivirus*

Genul *Coltivirus*

Caracteristici morfologice și genetice

- Dimensiuni, 60-80 nm, fără anvelopă,
- capsidă dublu stratificată, simetrie icosaedrică,
- genom ARN bicatenar segmentat → conține 8-10 segmente ce codifică proteine virale,
- aspect distinct:
 - *Reovirus*: capsidă cu proeminențe externe,
 - *Rotavirus*: strat extern neted, strat intern zimțat.

Genul *Rotavirus*

Patogeneză și simptomatologie

- transmitere fecal-orală → contaminare prin alimente, apă sau contact direct,
- infecția afectează enterocitele vilozităților intestinale, perturbând absorbția de apă și electroliți,
- simptome principale:
 - diaree severă, febră, vărsături → risc major de deshidratare la sugari și copii mici.

Diagnostic de laborator

Teste Serologice (detectia anticorpilor)

- ELISA – detectează antigenul viral în materii fecale (metoda cea mai utilizată),
- fixarea complementului, RIA – identifică anticorpi specifici;

Biologie moleculară (metoda de elecție)

- RT-PCR – detectează ARN-ul viral în materii fecale → sensibilitate ridicată;

Teste imunocromatografice rapide

- detectează rapid antigenul viral în scaun → utile pentru diagnostic la punctul de îngrijire.

Profilaxie și prevenire

- vaccinare orală cu virus viu atenuat (Rotarix, RotaTeq),
- OMS recomandă includerea vaccinării anti-rotavirale în programele naționale de imunizare → a redus semnificativ incidența și severitatea infecțiilor.

Familia *Togaviridae*

Virusurile *Togaviridae* afectează în principal animale și artropode, dar pot provoca infecții severe la om. Cele mai relevante genuri sunt:

Genul *Alphavirus* – transmis prin țânțari, poate cauza encefalite,

Genul *Rubivirus* – include virusul rubeolic, responsabil de rubeolă și rubeola congenitală.

Caracteristici morfologice și genetice

- dimensiuni, 40-70 nm, sferice și anvelopate,
- anvelopă lipoproteică, conținând glicoproteinele E1 și E2 → implicate în atașarea la celulele gazdă,

- capsidă icosaedrică, formată din proteina C și 3 proteine non-structurale (NS1, NS2, NS3),
- genom ARN monocatenar, polaritate pozitivă → replicare rapidă prin înmugurire celulară.

Genul *Rubivirus* – virusul rubeolic

Patogeneză și simptomatologie

- transmitere respiratorie → replicare inițială în mucoasa rinofaringiană,
- se răspândește prin ganglionii limfatici regionali, apoi prin viremie,
- perioadă de incubație este de 2-3 săptămâni,
- simptome principale:
 - erupție maculo-papuloasă (inițial facială, extinsă ulterior),
 - adenopatie caracteristică (preauriculară, occipitală, latero-cervicală);
- infecția congenitală (*rubeola congenitală*) poate provoca:
 - avort spontan, moarte fetală,
 - ,alformații severe (cataractă, microcefalie, cardiopatii, hepatosplenomegalie).

Diagnostic de laborator

Teste serologice (detectia anticorpilor specifici)

- ELISA → metoda principală pentru IgM și IgG anti-rubeolici,
- hemaglutinoinhibare (HAI) → detectează anticorpi împotriva proteinei E1,
- latex-aglutinare → test rapid, mai puțin sensibil,
- RIA (Radioimunotest) → sensibilitate ridicată,
- imunofluorescență indirectă → detectare anticorpi în ser;

Biologie moleculară (detecția ARN viral)

- RT-PCR – identifică ARN viral în sânge, exsudat faringian, LCR sau lichid amniotic,
- utilizat în infecțiile congenitale pentru confirmarea diagnosticului.

Profilaxie și prevenire

- vaccinare cu ROR (Rujeolă-Oreion-Rubeolă) →
 - prima doză la 12 luni,
 - rapel la 5 ani;
- vaccinarea este esențială pentru prevenirea malformațiilor congenitale.

Virusurile hepatitice

Virusurile hepatitice sunt agenți patogeni diverși, aparținând unor familii diferite, dar având în comun tropismul pentru hepatocite. Acestea determină infecții hepatice variind de la forme asimptomatice până la hepatite acute și cronice, cu potențial evolutiv spre ciroză și carcinom hepatocelular.

Tabelul 11. Clasificare și caracteristici morfologice

Virus	Familie	Genom	Transmitere	Evoluție	Cronicizare
HAV	<i>Picornaviridae</i>	ARN	Fecal-orală	Acută, autolimitantă	NU
HBV	<i>Hepadnaviridae</i>	ADN	Parenterală, sexuală, verticală	Acută sau cronică	DA
HCV	<i>Flaviviridae</i>	ARN	Parenterală, sexuală	Asimptomatică → cronică	DA
HDV	<i>Viroid-like</i>	ARN	Parenterală (doar cu HBV)	Cronică, severă	DA
HEV	<i>Hepeviridae</i>	ARN	Fecal-orală (zoonotică?)	Acută, severă la gravide	NU
HFV	<i>Necunoscută</i>	ADN	Necunoscută	Hepatită acută	?

Virusul hepatitic A (HAV)

- **Transmitere**, fecal-orală, prin apă/alimente contaminate.
- **Diagnostic de laborator**
 - Serologic: detectare IgM anti-HAV prin ELISA (marker al infecției acute);
 - Biologie moleculară: RT-PCR pentru ARN viral (rar utilizat);
 - Culturi virale: dificil de realizat.
- **Profilaxie**- vaccinare cu virus inactivat.

Virusul hepatitic B (HBV)

- **Transmitere**: parenterală, sexuală, verticală.
- **Diagnostic de laborator**
 - Serologic (ELISA):
 - AgHBs – prezent în infecția acută/cronică,
 - IgM anti-HBc – infecție acută recentă,
 - IgG anti-HBc – infecție veche,
 - AgHBe – replicare virală activă (infecțios),
 - Anti-HBs – imunitate (post-infecție sau post-vaccinare);
 - PCR, detectare ADN-HBV pentru evaluarea replicării virale.
- **Profilaxie**: vaccinare cu antigen de suprafață recombinant.

Virusul hepatitic C (HCV)

- **Transmitere**, sânge, seringă contaminată, contact sexual.
- **Diagnostic de laborator**
 - Serologic (ELISA, RIBA) – detectare anticorpi anti-HCV,
 - PCR – determină ARN-HCV, confirmă infecția active,
 - genotipare – importantă pentru ghidarea tratamentului antiviral.
- **Profilaxie**, nu există vaccin, se testează metode bazate pe imunitate celulară.

Virusul hepatitic D (HDV)

- Necesari HBV pentru replicare (virus defectiv).
- **Diagnostic de laborator**
 - Serologic (ELISA):
 - IgM anti-HDV – infecție acută,
 - IgG anti-HDV – infecție cronică;
 - PCR – ARN-HDV (confirmare infecție activă).
- **Profilaxie**, vaccinarea anti-HBV previne și HDV.

Virusul hepatitic E (HEV)

- **Transmitere**, fecal-orală, posibil zoonotică.
- **Diagnostic de laborator**
 - Serologic: IgM anti-HEV (infecție acută), IgG anti-HEV (infecție trecută);
 - PCR – detectare ARN-HEV în ser/scaun.
- **Profilaxie**, vaccin experimental în anumite regiuni.

Virusul hepatitic F (HFV) – virus ipotetic

- **Structură**, ADN, posibil transmis pe cale digestivă.
- **Diagnostic de laborator**, neclar.

Familia *Retroviridae*

Retrovirusurile sunt virusuri ARN care își integrează genomul în ADN-ul celulei gazdă prin intermediul revers-transcriptazei, generând infecții persistente. Această familie cuprinde virusuri oncogene și virusuri imunosupresoare, cu potențial de a cauza boli maligne și sindroame de imunodeficiență.

Tabelul 12. Clasificarea familiei *Retroviridae*

Subfamilie	Virusuri relevante	Patologie
<i>Oncovirinae</i>	HTLV-I, HTLV-II	Leucemie, limfom
<i>Lentivirinae</i>	HIV-1, HIV-2	SIDA
<i>Spumavirinae</i>	Spumavirusuri	Fără patologie semnificativă la om

Morfologie și replicare

- virion sferic (100 nm), acoperit de anvelopă lipidică cu spiculi glicoproteici;
- genom ARN diploid, cu 3 gene principale:
 - gag – proteine capsidale (p24 este marker serologic),
 - pol – enzime virale (revers-transcriptază, integraza, proteaza),
 - env – proteine anvelopare (gp120 și gp41 în HIV);
- ciclu replicativ:
 - atașare la receptorii celulari (ex. CD4 pentru HIV),
 - conversie ARN în ADN proviral (revers-transcripție),
 - integrare în genomul gazdă (enzima integraza),
 - expresia genică → sinteză proteine virale,
 - asamblare și eliberare prin înmugurire;
- variabilitate genetică ridicată, prin:
 - rate mari de mutații (revers-transcriptaza nu corectează erorile),
 - recombinare între tulpini diferite,
 - evitarea răspunsului imun și dezvoltarea rezistenței la tratament.

HTLV-I și HTLV-II

- **Transmitere**, parenterală, sexuală, transplacentară.
- **Boală**: leucemie cu celule T, limfoame.
- **Diagnostic**
 - Serologic: ELISA, Western Blot (anticorpi anti-HTLV);
 - PCR: detecția ARN viral;
 - Citologie: limfocitoză persistentă, prezența celulelor leucemice.

HIV-1 și HIV-2

- **Transmitere**, sexuală, sânge (transfuzii, droguri IV), verticală (mamă-făt).
- **Patogeneză**
 - distruge limfocitele T CD4+, determinând imunodeficiență,
 - predispune la infecții oportuniste (ex. *Pneumocystis*, *Candida*, *CMV*).
 - afectează SNC, determinând encefalopatie HIV.

Diagnostic de laborator HIV

- Cultivarea virusului (rar utilizată)
 - se face pe linii celulare T sau B,
 - detectare prin ELISA, PCR;
- Serologie (testare standard)
 - screening ELISA (testează anticorpi anti-HIV),
 - confirmare Western Blot (detectează proteine virale specifice: gp41, gp120, p24);
- Teste moleculare (pentru încărcătura virală și stadializare)
 - PCR / RT-PCR – detectează ARN HIV în sânge,

- b-ADN (branched DNA test) – cuantifică ARN viral;
- Teste imunologice
- numărare limfocite CD4+: evaluare severitate imunodeficiență.

Epidemiologie și profilaxie

- prevenție
 - contact sexual protejat, screening donatori de sânge, măsuri de igienă,
 - profilaxie post-expunere (PEP), tratament antiretroviral timp de 28 zile;
- vaccin anti-HIV care este în cercetare, însă prezintă dificultăți majore din cauza variabilității genetice a virusului.

XXV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE PARAZIȚI

Parazitologia medicală este ramura științifică ce se ocupă cu studiul morfologiei, biologiei și impactului pe care paraziții îl au asupra organismului uman. Aceasta include epidemiologia, simptomatologia, metodele de diagnostic și strategiile de prevenire și combatere a infecțiilor parazitare.

Clasificarea paraziților și patogeneza

Paraziții care infectează omul se clasifică în trei categorii principale:

1. Protozoare (Protozoa) - organisme unicelulare ce pot cauza diferite boli infecțioase. Se subdivid în patru clase:

- **Clasa Sporozoa (Apicomplexa)** - paraziți intracelulari importanți din punct de vedere epidemiologic, clinic și veterinar:
 - *Plasmodium spp.* (determină malaria) - invadează eritrocitele, provocând hemoliză, anemie, febră ciclică și afecțiuni hepatosplenice;
 - *Toxoplasma gondii* (toxoplasmoza) - afectează sistemul nervos central, generând leziuni cerebrale, retiniene și sindrom congenital sever.
 - *Cryptosporidium parvum/hominis* – se localizează în celulele epiteliale intestinale. Produce diaree severă, mai ales la pacienții imunodeprimați.

- **Clasa Mastigophora (Flagelata / Metamonada / Euglenoza)**
 - *Giardia lamblia* (*G.intestinalis* / *G.duodenalis*) - aderă la mucoasa intestinală, determinând malabsorbție și diaree cronică.
 - *Trypanosoma spp.* (boala somnului, boala Chagas) - produce meningoencefalită progresivă, cardiomiopatie și insuficiență cardiacă.
 - *Trichomonas vaginalis* – agentul trichomonazei urogenitale (boală cu transmitere sexuală).
 - *Leishmania spp.* – agentul leishmaniozelor tegumentare (cutanată și mucocutanată), respectiv leishmaniozelor viscerale.

- **Clasa Sarcodina (Rhizopoda / Amoebozoa)** - protozoare unicelulare, ce se deplasează și se hrănesc prin pseudopode (proiecții citoplasmatiche):
 - *Entamoeba histolytica* (amoebiaza) - agentul amoebiazei intestinale și extraintestinale
 - *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis* - amoebe nepatogene
 - *Acanthamoeba spp.* – provoacă encefalită amebiană granulomatoasă (la pacienții imunodeprimați) și keratite severe (la purtătorii de lentile de contact)

- **Clasa Ciliata (Infuzorii)**
 - *Balantidium coli* (balantidiaza) - determină colita hemoragică, inflamație și necroza mucoasei intestinale.

2. Helminți (Helminthes) - paraziți metazoari (pluricelulari), cu importanță majoră în patologia umană:

- **Trematoda (viermi plăți cu ventuze)**
 - *Fasciola hepatica* (fascioloza) - afectează ficatul și căile biliare, provocând inflamație cronică și colangită;
 - *Schistosoma spp.* (schistosomiaza) - produce fibroză hepatică, hipertensiune portală și leziuni uro-genitale.
 - *Clonorchis sinensis* – produce colangită, litiază biliară.

- **Cestoda (viermi plati intestinali sau tisulari)**
 - Tenii cu dezvoltare intestinală la om (cestodoze intestinale): *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Diphyllobothrium latum*.
 - Tenii cu dezvoltare tisulară la om (larvocestoze): *Echinococcus spp.* (hidatidoza) - formarea de chisturi hepatice sau pulmonare (chisturi hidatice), cu risc de complicații severe.

- **Nemathelminthes / Nematoda (viermi cilindrici)**
 - *Ascaris lumbricoides* (ascaridioza) - migrarea larvelor prin plămâni și ficat provoacă inflamație și obstrucții intestinale;
 - *Trichinella spiralis* (trichineloză) - larvele invadează musculatura scheletică, provocând mialgii severe și miocardită.

3. Artropode (Arthropoda) - organisme ce pot fi ectoparaziți sau vectori ai altor boli:

- **Subîncrângătura Chelicerata – clasa Arachnida:**
 - *Sarcoptes scabiei* (scabia) - determină prurit sever și inflamație cutanată prin excoriații mecanice.
 - *Ixodes ricinus* – vector principal al bolii Lyme (*Borrelia burgdorferi*)

- *Demacantor spp.*
 - *Demodex spp.* (*Demodex folliculorum*, *Demodex brevis*) – implicat în blefarite cornice, dermatite faciale.
- **Subîncręgătura Hexapoda** – 3 ordine (Diptera, Hemiptera, Anoplura):
 - *Anopheles spp.* (transmite malarie) - rol de vector pentru *Plasmodium spp*
 - *Glossina spp.* (mușca tsetse) – vector pentru *Trypanosoma brucei*, provoacă tripanosomiaza africană.
 - *Pediculus humanus capitis/corporis* – provoacă pediculoza.
 - *Pthirus pubis* - nu este vector de boli sistemice, dar este asociat frecvent cu alți agenți ce provoacă boli cu transmitere sexuală (chlamydia, gonorrhoea, syphilis).
 - *Triatoma spp.* (boala Chagas) - transmitere vectorială a *Trypanosoma cruzi*, afectând inima și sistemul digestiv.

Diagnostic de laborator al infecțiilor parazitare

Diagnosticarea bolilor parazitare implică metode directe și indirecte.

Metode directe

Acestea presupun detectarea parazitului sau a unor forme ale acestuia în probe biologice:

- examinare microscopică – utilizată pentru protozoare și helminti în materii fecale, sânge, lichid cefalorahidian.

Tabelul 13. Exemple de paraziți observați microscopic

PARAZIT	TIP DE EȘANTION BIOLOGIC	FORMA OBSERVATĂ
<i>Giardia lamblia</i>	Materii fecale	Chisturi, trofozoți
<i>Entamoeba histolytica</i>	Materii fecale	Chisturi, trofozoți
<i>Plasmodium spp.</i>	Sânge	Trofozoți, gametocite
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Materii fecale	Ouă
<i>Taenia spp.</i>	Materii fecale	Ouă, fragmente de proglote

- colorații speciali – colorația Giemsa pentru *Plasmodium*, Lugol pentru chisturile de *Entamoeba histolytica*
- culturi microbiologice – utilizate rar pentru protozoare
- teste antigenice rapide (ELISA, imunocromatografie) – detecția antigenilor de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica*
- PCR (reacția de polimerizare în lanț) – detectează ADN-ul paraziților în probe biologice;
- biopsii tisulare – utilizate în cazul infecțiilor parazitare tisulare (ex. *Trichinella spiralis*, *Leishmania spp.*)

Examen coproparazitologic

Este esențial în diagnosticul infecțiilor intestinale și include:

- examen macroscopic – observarea paraziților adulți sau a segmentelor acestora

Este o metodă simplă și utilă în diagnosticarea anumitor infecții parazitare, în special a celor cu helminti (viermi). Se bazează pe observarea cu ochiul liber a paraziților sau a fragmentelor acestora în materiile fecale.

Reprezintă un ghid de orientare rapidă pentru laborator și medical clinician, dar poate necesita confirmare prin examenul microscopic, pentru identificarea speciilor și-a stadiilor parazitare (ouă, larve, chisturi).

- examen microscopic – depistarea ouălor, chisturilor sau larvelor prin metode de concentrare:

- metoda Fülleborn (metoda de flotare în soluție saturată)

Metoda Fülleborn reprezintă o tehnică coproscopice de flotare utilizată predominant pentru evidențierea ouălor de helminți în probe fecale, având aplicabilitate în diagnosticul și evaluarea cantitativă a parazitozelor intestinale.

Principiul metodei se bazează pe diferențele de densitate dintre ouăle de helminți și detritusul fecal, utilizând o soluție saturată cu greutate specifică mai mare decât cea a resturilor fecale, dar mai mică decât cea a ouălor parazitare. În aceste condiții, ouăle migrează spre suprafața lichidului, unde pot fi colectate pentru examinare microscopică. Procedura constă în suspendarea probei fecale într-o soluție saturată cu densitate controlată — în mod frecvent clorură de sodiu sau sulfat de magneziu — a cărei greutate specifică este intermediară între cea a ouălor de helminți și cea a particulelor fecale.

După o omogenizare riguroasă și o fază de flotare/incubație, ouăle, având o densitate mai mare decât soluția, migrează către suprafață și se acumulează la nivelul meniscului lichidului, de unde pot fi recoltate cu precizie pentru examinare microscopică.

Protocol de laborator:

- Se prelevează aproximativ 1–3 g de materii fecale proaspete.
- Proba se emulsionează într-un volum adecvat de soluție saturată de NaCl (aproximativ 10 – 15 mL), până la obținerea unei suspensii omogene. Suspensia se filtrează prin tifon într-un tub conic curat.

- Se completează tubul cu soluție saturată până la formarea unui menisc convex.
- Se aplică cu grijă o lameluță deasupra meniscului, evitând formarea de bule de aer.
- Se lasă tubul în repaus (10–15 minute) pentru a permite flotarea ouălor la suprafață.
- Lamela se ridică vertical și se plasează pe o lamă de microscop.
- Preparatul se examinează la microscop (40x și 100x), iar ouăle sunt identificate și cuantificate.

– metoda Kalantaryan (metoda de sedimentare gravitațională)

Este o tehnică de sedimentare gravitațională utilizată pentru detecția ouălor de helminți în materiile fecale. Aceasta se bazează pe diferențele de greutate specifică dintre ouăle de paraziți și componentele ușoare ale materiei fecale. Într-un mediu lichid (de obicei apă distilată), ouăle, având o densitate mai mare, se depun prin gravitație la baza recipientului, facilitând recoltarea și examinarea lor microscopică. Metoda este eficientă în special pentru ouăle grele de trematode (ex. *Fasciola hepatica*), care pot fi pierdute prin flotare.

Protocol de laborator:

- Se prelevează aproximativ 2–5 g de materii fecale proaspete.
- Proba se emulsionează într-un volum de apă (15–20 mL), până la obținerea unei suspensii omogene. Suspensia se filtrează prin tifon într-un recipient cilindric curat pentru a îndepărta particulele grosiere.
- Se completează volumul până la aprox. 100 mL cu apă, apoi se amestecă bine.
- Se lasă suspensia în repaus pentru minimum 2 ore (maxim 4–6 ore) pentru a permite sedimentarea completă a ouălor.

- Se îndepărtează cu grijă supernatantul fără a agita sedimentul. După care se agită ușor sedimentul rămas, din care se ia o picătură și se transferă pe o lamă.
- Se acoperă cu o lameluță și se examinează microscopic (40x și 100x).
 - testul cu bandă adezivă pentru *Enterobius vermicularis* (testul Graham, metoda amprentei anale)

Constă în aplicarea unei benzi adezive transparente în regiunea perianală pentru recoltarea ouălor de *Enterobius vermicularis*, care sunt depuse nocturn de femelele adulte. Banda este apoi transferată pe o lamă de microscop, permițând examinarea directă a ouălor la microscop. Metoda este sensibilă, non-invazivă și recomandată pentru diagnosticarea oxiuriazii, în special la copii. Pentru creșterea sensibilității diagnostice, se recomandă recoltarea în trei zile consecutive. În cazuri simptomatice persistente și rezultate negative, se recomandă repetarea testului sau corelarea cu alte metode diagnostice (anamneză, examen clinic, test serologic în cazuri atipice).

Protocol de laborator:

- Recoltarea se efectuează dimineața devreme, înainte de defecație și igienă personală, pentru a maximiza șansele de detecție.
- Se decupează o bucată de bandă adezivă transparentă de aproximativ 5–6 cm.
- Banda se aplică ferm pe regiunea perianală, cu partea adezivă spre piele, timp de 15–20 secunde. Se dezlipește cu grijă și se aplică imediat, fără formarea de bule de aer, pe o lamă de microscop, cu partea adezivă în jos.
- Lamelele se etichetează corespunzător și se examinează microscopic (preferabil în aceeași zi).
- Citirea la microscop se efectuează la 100x, apoi la 400x, pentru confirmarea ouălor de *E. vermicularis* (formă ovală, asimetrică, cu un perete gros și conținut embrionar caracteristic).

- metoda de sedimentare cu formol-eter pentru detectarea ouălor și chisturilor parazitare (testul Baileger)

Este o tehnică de concentrare a ouălor de helminți și a chisturilor de protozoare prin sedimentare în prezența unei soluții de formol și eter. Particulele parazitare sunt separate de detritusul fecal pe baza diferenței de densitate, fiind concentrate în sedimentul rezultat, care este apoi examinat microscopic. Metoda este eficientă pentru creșterea sensibilității în diagnosticul parazitozelor intestinale. Este o metodă sensibilă pentru detectarea chisturilor de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, și-a ouălor de helminți.

Protocol de laborator:

- Prepararea suspensiei fecale: se prelevează 2–4 grame de materii fecale proaspete. Se emulsionează într-un pahar sau tub conic cu 20–30 mL de soluție salină (NaCl 0,9%), după care suspensia se filtrează prin tifon într-un tub conic curat.
- Se adaugă 2–3 mL de soluție de formol 10% la suspensia filtrată, se omogenizează, apoi se lasă în repaus 5 – 10 minute, după care se adaugă 3–4 mL de eter etilic (sau acetat de etil). Se închide tubul ermetic și se agită energic timp de 30 secunde.
- Se centrifughează la 1500–2000 rpm timp de 3–5 minute. După centrifugare, se observă formarea a patru straturi: etanol/eter (stratul superior), dop de resturi fecale, stratul de formol, sediment (conține ouă și chisturi).
- Din sediment, se prelevează 1–2 picături, se montează pe lamă și se examinează microscopic la 100x și 400x.

– metoda Telemann-Langeron

Este o tehnică coproparazitologică de concentrare prin sedimentare, folosită în laborator pentru depistarea ouălor și larvelor de paraziți intestinali care ajută la evidențierea paraziților în probe în care aceștia se află într-un număr mic. Metoda se bazează pe distrugerea resturilor fecale și sedimentarea ouălor de helminți, în care se amestecă o cantitate mică de materii fecale cu o soluție de hidroxid de sodiu 10%, se adaugă eter, se centrifughează, iar după care sedimentul este examinat la microscop.

- teste de imunofluorescență – pentru detectarea antigenelor parazitare:

Sunt metode moderne, sensibile și specifice pentru detectarea antigenelor sau anticorpilor parazitari, care utilizează anticorpi marcați cu un fluorocrom (substanță fluorescentă) care se leagă de antigenele parazitare. Proba este examinată la microscop cu fluorescență, iar cu ajutorul acestor metode moderne se pot detecta infecții active (prin antigene) sau o expunere trecută (prin anticorpi), astfel fiind foarte utile în screening-ul și confirmarea cazurilor clinice atipice.

Examinarea sângelui

Utilizată pentru diagnosticarea infecțiilor sistemice:

- frotiu sanguin colorat Giemsa – detectarea hematozoarelor (*Plasmodium spp.*, *Trypanosoma*, *Leishmania*);

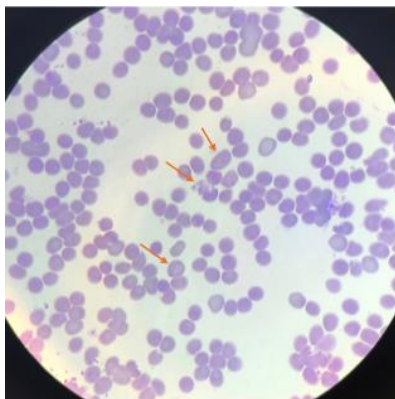


Figura 17. Frotiu sanguin colorație Giemsa – detectare *Plasmodium spp.*

- metoda de filtrare Knott – detectarea microfilariei (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*);

Metoda de filtrare Knott este o tehnică specializată utilizată în principal pentru detecția și cuantificarea microfilariei în sângele periferic, având aplicabilitate predominantă în diagnosticul parazitozelor sangvine. Această metodă este recunoscută pentru sensibilitatea sa crescută în comparație cu examinarea directă a frotiurilor sanguine. Tehnica de laborator, presupune adăugarea unei soluții de formalină 2% la o cantitate determinată de sânge integral, cu scopul de a distruge hematiile (liza sangvină), amestecul se centrifughează, apoi sedimentul este recoltat, colorat (albastru de metilen sau Giemsa), apoi examinat microscopic pentru identificarea morfologică a microfilariei.

- imunocromatografie rapidă – pentru antigenele specifice *Plasmodium* spp. sau *Leishmania* spp.;
- teste serologice (ELISA, Western Blot) – pentru depistarea anticorpilor specifici în infecții cronice (*Toxoplasma gondii*, *Echinococcus* spp.);
- hematologie clinică – eozinofilie marcată în helmintiaze.

Examinarea altor fluide biologice

- LCR (lichid cefalorahidian) – pentru *Trypanosoma brucei*, *Naegleria fowleri*;
- lavaj bronhoalveolar – pentru *Pneumocystis jirovecii*. Acesta se indică în cazul pacienților cu simptomatologie respiratorie acută/subacută (dispnee, tuse uscată, febră) sau cu risc de infectare cu *Pneumocystis pneumonia*.
- secreții vaginale/uretrale – pentru *Trichomonas vaginalis* (frotiu umed).

XXVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PROVOCATE DE FUNGI

Fungii reprezintă un grup heterogen de microorganisme eucariote, larg răspândite în natură, care pot avea atât rol saprofit, cât și patogen pentru organismul uman. Aceștia sunt prezenți în sol, aer, apă și pe suprafața organismelor vii, iar dintre numeroasele specii existente, doar o parte sunt implicate în patologia umană.

Fungii pot produce infecții superficiale, invazive sau oportuniste, în funcție de tipul agentului și de statusul imun al gazdei. În ultimii ani, importanța clinică a fungilor a crescut semnificativ, în special datorită creșterii numărului de pacienți imunocompromiși și utilizării frecvente a terapiei antimicrobiene și imunosupresoare.

Caracteristici generale ale fungilor

Fungii sunt:

- organisme eucariote
- lipsite de clorofilă
- heterotrofe
- capabilă de sporulare
- ubiquitar distribuite

Aceștia pot exista sub mai multe forme:

- levuri (unicelulare)
- fungi filamentoși (cu hife și micelii)
- fungi dimorfi (cu două forme în funcție de temperatură și mediu)

Dermatofiti (ex. *Trichophyton*, *Epidermophyton*) sunt fungi filamentoși specializați în degradarea keratinei. Aceștia produc infecții superficiale localizate la nivelul pielii, unghiilor și firului de păr. Infecțiile dermatofitice sunt frecvente și se caracterizează prin localizare strict superficială și nu invadează în mod obișnuit țesuturile profunde.

Levurile, reprezentate în principal de genul *Candida*, fac parte din microbiota normală a organismului (cavitate bucală, tract digestiv, vagin). În condiții normale sunt inofensive, însă în situații de dezechilibru sau imunosupresie pot deveni patogene. Acestea pot produce infecții muco-cutanate, infecții invazive (candidemie).

Mucegaiurile (fungii filamentoși), precum *Aspergillus*, *Fusarium* și *Penicillium*, sunt larg răspândiți în mediu și se transmit frecvent prin inhalarea sporilor. Aceștia pot produce infecții respiratorii, infecții invazive sistemice. *Aspergillus fumigatus* este un agent important al infecțiilor pulmonare, putând disemina în alte organe, în special la pacienții imunocompromiși.

Fungi oportuniști speciali, *Pneumocystis jirovecii* este un fung atipic care determină pneumonie severă, în special la pacienții cu imunodeficiențe (ex. HIV/SIDA). Infecția se transmite pe cale aeriană și poate avea evoluție severă, cu mortalitate variabilă.

Fungii dimorfi (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Sporothrix*) au capacitatea de a exista sub două forme:

- miceliană în mediul extern
- levurică în organism

Aceștia sunt responsabili de micoze sistemice, afectând în special plămânii, sistemul nervos central, organele interne.

Tabelul 14. Principalele genuri și specii de fungi cu importanță în patologia umană

Categoria principală	Genuri reprezentative	Tip morfologic	Caracteristici principale	Tip de infecții
Dermatofiți	<i>Epidermophyton, Trichophyton</i>	Filamentoși	Keratinofili, invadează țesuturi superficiale (piele, păr, unghii)	Micoze superficiale (dermatomicoze)
Levuri	<i>Candida</i>	Unicelulare	Comensale ale organismului, se multiplică prin înmugurire	Infecții oportuniste (candidoze)
Levuri levuriforme	<i>Trichosporon</i> (ex: <i>T. asahii, T. cutaneum</i>)	Levuriforme	Pot forma pseudomicelii, oportuniste	Infecții sistemice și cutanate
Fungi oportuniști filamentoși (mucegaiuri)	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium</i>	Filamentoși	Saprofite, produc spori, frecvent inhalate	Infecții respiratorii și sistemice
Fungi oportuniști speciali	<i>Pneumocystis</i>	Atipic	Nu este clasic filament sau levură, adaptat la plămân	Pneumonie la imunodeprimați
Fungi dimorfi	<i>Blastomyces, Coccidioides, Histoplasma, Sporothrix</i>	Dimorfi	Formă levurică în organism, miceliană în mediu	Micoze sistemice
Fungi patogeni oportuniști	<i>Candida, Aspergillus</i>	Variabil	Profită de scăderea imunității	Infecții invazive
Fungi saprofiți	Majoritatea fungilor din mediu	Variabil	Trăiesc în sol și materie organică	Rareori patogeni

Diagnosticul micologic

Diagnosticul micologic reprezintă totalitatea metodelor de laborator utilizate pentru izolarea, identificarea și caracterizarea fungilor implicați în infecțiile umane. Acesta are un rol important în stabilirea diagnosticului etiologic și în alegerea terapiei antifungice adecvate.

Tabelul 15. Tipuri de micoze, etiologie și clasificare

Tip micoză	Localizare	Afecțiuni	Agent etiologic (genuri și exemple)	Creștere
Superficiale	Păr, piele	Pitiriazis versicolor, Tinea nigra, piedra	<i>Malassezia furfur</i> , <i>Exophila</i> , <i>Trichosporon</i> (<i>T. asahii</i> , <i>T. asteroides</i> , <i>T. cutaneum</i> , <i>T. dermatis</i> , <i>T. dohaense</i> , <i>T. inkin</i> , <i>T. loubieri</i> , <i>T. mucoides</i> , <i>T. ovoides</i>)	L (levuri) / F (filamente)
Cutanate	Epiderm, păr, unghii	Tinea (microsporia, tricofitia, epidermofitii)	<i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i>	F
Subcutanate	Derm	Sporotricoză	<i>Sporothrix</i>	L, F
Sistemice	Organe interne	Histoplasmoză, Coccidioidomicoză, Blastomicoză	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i>	L / Endospori / L
Oportuniste	Organe interne	Criptococoză, Candidoză, Aspergiloză, Pneumonie pneumocistică	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>	L / L / F / -

Procesul diagnostic este unul etapizat și include următoarele faze:

1. Recoltarea produsului patologic

Recoltarea reprezintă prima și una dintre cele mai importante etape, deoarece calitatea probei influențează direct rezultatul final.

Tipuri de produse recoltate: scuame, unghii, fire de păr (dermatofitii), secreții (vaginale, orale, otice), sputa, sânge (hemocultură), lichid cefalorahidian (LCR), puroi, fragmente tisulare (biopsii)

Recoltarea produsului patologic, trebuie efectuată în condiții sterile și de preferat, înaintea inițierii tratamentului antifungic, pentru a evita rezultatele fals negative. Transportul rapid la laborator și manipularea corectă sunt esențiale pentru menținerea viabilității fungilor și pentru prevenirea contaminării.

2. Examenul microscopic

Examenul microscopic este o metodă rapidă, orientativă, care permite evidențierea directă a fungilor în produsul patologic. Acesta se realizează prin preparatul nativ între lamă și lamelă, utilizând soluții disociante precum hidroxidul de potasiu sau sodiu, care dizolvă materialul organic și permit evidențierea structurilor fungice, cum ar fi hifele, spori sau celulele levurice. De asemenea, se pot utiliza frotiuri colorate, precum cele cu albastru de metilen sau Gram, care facilitează observarea detaliată a elementelor fungice. Deși această etapă confirmă prezența fungilor, ea nu permite identificarea exactă a speciei.

3. Cultivarea fungilor

Cultivarea reprezintă etapa esențială pentru confirmarea diagnosticului și izolarea agentului etiologic.

Medii de cultură utilizate:

- Sabouraud simplu
- Sabouraud cu antibiotice (gentamicină, cloramfenicol)
- Sabouraud cu actidionă și roșu fenol (Mycoline)
- Medii cromogene (Chromagar)

Aceste medii inhibă dezvoltarea bacteriilor și favorizează creșterea fungilor, permițând observarea caracteristicilor culturale, cum ar fi culoarea, textura și viteza de creștere a coloniilor. Incubarea se face la temperaturi adecvate (25–30°C), iar durata variază în funcție de tipul fungului, de la câteva zile în cazul levurilor până la câteva săptămâni pentru dermatofiți.

4. Identificarea fungilor

Etapa de identificare a fungilor reprezintă una dintre cele mai importante faze ale diagnosticului micologic, deoarece permite stabilirea exactă a speciei implicate în infecție și, implicit, alegerea unui tratament antifungic adecvat.

Identificarea începe cu analiza caracterelor morfologice, realizată prin examinarea microscopică a coloniilor dezvoltate pe mediile de cultură. Se urmăresc elemente precum tipul de hife (septate sau neseptate), modul de ramificare, precum și prezența și tipul sporilor (macroconidii, microconidii, blastospori sau clamidospori). Aceste caracteristici sunt esențiale în diferențierea marilor grupe de fungi, de exemplu dermatofiții sau mucegaiurile. În cazul levurilor, se observă forma celulelor, modul de înmugurire și eventual prezența pseudomiceliilor.

În paralel, se analizează caracterele culturale ale fungilor, care includ aspectul macroscopic al coloniilor. Se evaluează culoarea, consistența (cremoasă, uscată, pufoasă), suprafața, marginea și viteza de creștere. De exemplu, coloniile de *Candida albicans* sunt tipic albe, cremoase și lucioase, în timp ce mucegaiurile, precum *Aspergillus*, dezvoltă colonii filamentoase, pigmentate diferit în funcție de specie.

Un rol important îl au testele biochimice, care permit diferențierea speciilor pe baza capacității lor de a fermenta sau asimila diferite substraturi, în special zaharuri. Aceste teste sunt esențiale mai ales în identificarea levurilor din genul *Candida*, unde diferențierea între specii are implicații terapeutice majore. De asemenea, se pot utiliza teste specifice, cum este testul de filamentare, care permite identificarea rapidă a speciei *Candida albicans* prin formarea tuburilor germinative într-un timp scurt.

În practica modernă, identificarea este frecvent realizată cu ajutorul sistemelor comerciale standardizate și al analizatoarelor automate, cum ar fi

API 20 C AUX sau sistemul Vitek. Aceste metode utilizează baze de date extinse și profile biochimice pentru a identifica rapid și precis speciile fungice, reducând timpul de diagnostic și riscul de eroare umană.

5. Testarea sensibilității la antifungice

Ultima etapă este testarea sensibilității la antifungice, care constă în determinarea răspunsului fungului la diferite substanțe antifungice. Aceasta se realizează prin antifungigramă, teste E sau sisteme automatizate și are o importanță majoră în alegerea tratamentului optim, contribuind la prevenirea rezistenței și la creșterea eficienței terapiei.

Teste biochimice utilizate în diagnosticul micologic

În diagnosticul micologic, pe lângă testele morfologice și de cultura, se utilizează și teste biochimice care permit diferențierea microorganismelor pe baza capacității lor metabolice. Aceste teste sunt utilizate în special pentru levuri și fungi levuriformi, având rolul de a evidenția modul în care microorganismele utilizează diferite substraturi nutritive. Dintre acestea, testul TSI și testul cu citrat (Simmons) sunt exemple clasice de evaluare a activității metabolice.

Testul TSI (Triple Sugar Iron)

Testul TSI este utilizat pentru evidențierea capacității microorganismelor de a fermenta glucidele și de a produce gaze sau hidrogen sulfurat. Mediul conține trei zaharuri principale – glucoză, lactoză și zaharoză – precum și un indicator de pH și săruri de fier pentru detectarea hidrogenului sulfurat.

În urma însămânțării și incubării, interpretarea se bazează pe modificările de culoare ale mediului. Dacă microorganismul fermentează glucoza, mediul devine galben în partea inferioară (zona anaerobă).

Fermentarea lactozei și zaharozei determină colorarea galbenă și în partea superioară (zona aerobă). În absența fermentării, mediul rămâne roșu. Producerea de gaze este evidențiată prin formarea de bule sau fisuri în mediul solid, iar producerea de hidrogen sulfurat duce la apariția unei colorații negre datorită formării sulfului de fier.



Figura 18. Testul TSI (Triple Sugar Iron)

Testul cu citrat (Simmons)

Testul Simmons cu citrat este utilizat pentru a determina capacitatea microorganismelor de a utiliza citratul ca sursă unică de carbon. Mediul conține citrat de sodiu, săruri minerale și un indicator de pH (bromtimol albastru), care își modifică culoarea în funcție de metabolismul microorganismului.

Dacă microorganismul este capabil să metabolizeze citratul, acesta va produce compuși alcalini, ceea ce determină schimbarea culorii mediului din verde în albastru. Această modificare indică un rezultat pozitiv. În schimb, dacă microorganismul nu poate utiliza citratul, mediul rămâne verde, ceea ce indică un rezultat negativ și lipsa creșterii.

În micologie, acest test este utilizat în principal în cadrul panelurilor de teste biochimice destinate levurilor, contribuind la identificarea speciilor pe baza caracteristicilor metabolice specifice.

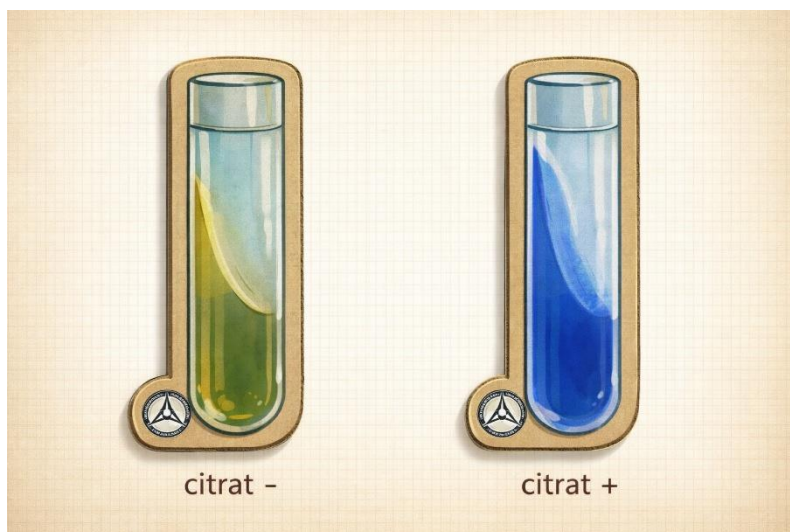


Figura 19. Testul cu citrat (Simmons)

Diagnosticul de laborator al dermatofitelor

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de dermatofiti are ca obiectiv evidențierea, izolarea și identificarea fungilor care invadează structurile bogate în keratină, respectiv pielea, firul de păr și unghiile. Dermatofitii sunt principalii agenți etiologici ai dermatomicozelor și aparțin în special genurilor *Trichophyton*, *Microsporum* și *Epidermophyton*. Confirmarea de laborator este importantă deoarece manifestările clinice pot semăna cu alte afecțiuni dermatologice, iar tratamentul corect depinde de identificarea agentului etiologic.

Recoltarea produsului patologic

Prima etapă a diagnosticului este recoltarea corectă a produsului patologic. În infecțiile dermatofitice, probele recoltate sunt reprezentate de

scuame cutanate, fire de păr, fragmente de barbă, mustață, sprâncene și fragmente unghiale, în funcție de sediul leziunii. Recoltarea trebuie făcută din zona activă a leziunii, deoarece acolo concentrația elementelor fungice este cea mai mare. În cazul leziunilor cutanate, se recoltează scuame de la periferia plăcii, unde procesul de invazie fungică este mai intens. În infecțiile firului de păr se aleg firele afectate, friabile sau rupte, iar în onicomicoze se recoltează fragmente din zona modificată a unghiei, de preferat din profunzime. Corectitudinea recoltării este importantă pentru obținerea unui rezultat concludent. O probă insuficientă, contaminată sau recoltată dintr-o zonă neadecvată poate duce la rezultate fals negative. De aceea, înainte de recoltare trebuie evitată aplicarea de antifungice locale sau tratamente cosmetice care pot reduce cantitatea de fungi viabili.

Examenul microscopic direct

După recoltare, se efectuează examenul microscopic direct, care reprezintă o metodă rapidă și orientativă de evidențiere a dermatofitelor în produsul patologic. Preparatul se realizează între lamă și lamelă, utilizând soluții de disociere, cel mai frecvent hidroxid de potasiu (KOH) în concentrație de 10–30% sau laurilsulfat de sodiu 5% în apă distilată. Rolul acestor soluții este de a dizolva materialul keratinizat, făcând mai ușor vizibile structurile fungice. La examinarea microscopică directă se pot observa filamente miceliene, artrospori și clamidospori. Filamentele miceliene apar sub forma unor structuri alungite, fine, septate, caracteristice fungilor filamentoși. Artrosporii rezultă prin fragmentarea hifelor și pot fi prezenți în special în infecțiile firului de păr. Clamidosporii sunt forme de rezistență și pot fi uneori evidențiați în preparatele directe. Examenul microscopic direct are avantajul rapidității, deoarece poate orienta diagnosticul chiar înainte de obținerea culturii, însă nu permite întotdeauna identificarea exactă a speciei. În anumite situații,

imunofluorescența sau examinarea la lampa Wood pot aduce informații suplimentare valoroase. Lampa Wood este utilă mai ales în unele infecții ale firului de păr, unde anumite specii pot produce fluorescență caracteristică. Totuși, aceste metode sunt complementare și nu înlocuiesc examenul direct și cultura. Deși în practica micologică preparatele colorate sunt utilizate mai rar pentru dermatofiți, acestea pot fi folosite atunci când este necesară o evidențiere mai clară a elementelor fungice. Printre colorațiile utilizate se numără albastrul de metilen, May-Grunwald-Giemsa și colorația Gram. Acestea pot evidenția filamente miceliene și artrospori, dar utilitatea lor este mai redusă față de preparatul direct cu soluții de clarificare.

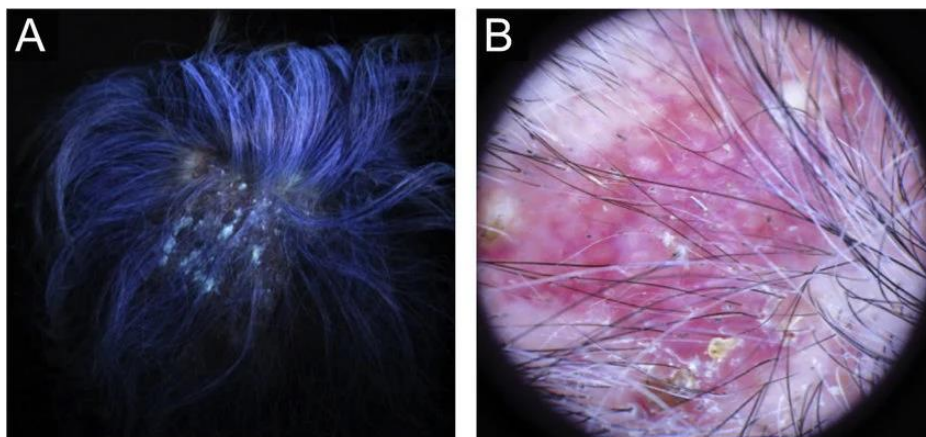


Figura 20. Aspecte caracteristice ale unei infecții fungice a scalpului (tinea capitis). În imaginea **A**, examinarea sub lumină Wood evidențiază fluorescența firelor de păr infectate, sugestivă pentru dermatofiți de tip *Microsporum*. Imaginea **B** ilustrează modificări dermatoscopice, precum eritem, descumare și leziuni inflamatorii, caracteristice infecției active a scalpului.

Izolarea

Izolarea dermatofiților se realizează prin însămânțarea produsului patologic pe medii de cultură speciale. În mod obișnuit, fragmentele recoltate se fragmentează și se însămânțează pe mediul Sabouraud simplu și pe mediul Sabouraud cu adaus de actidionă. Aceste medii sunt favorabile dezvoltării

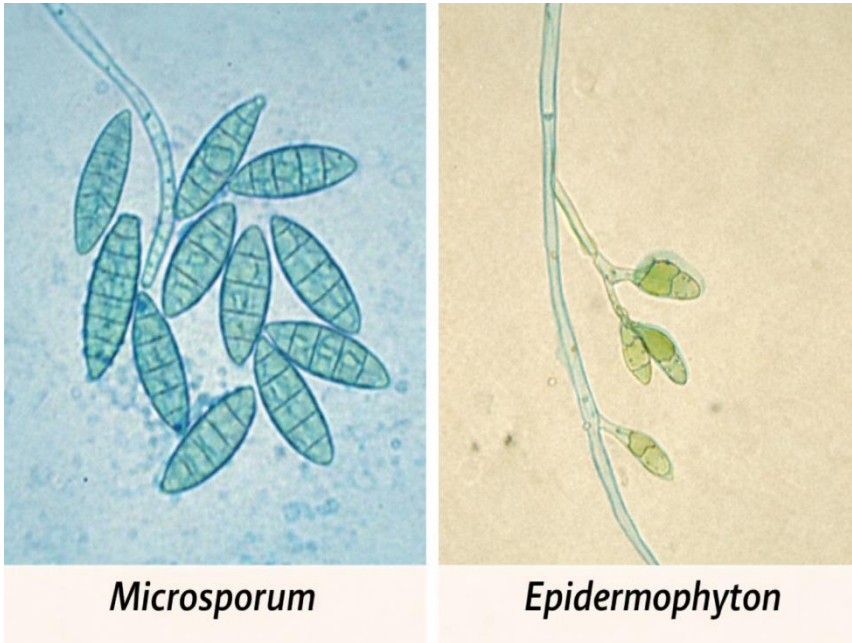
fungilor și permit limitarea contaminării bacteriene sau a creșterii altor fungi nedoriți. Incubarea culturilor se face la temperaturi de 25–28°C. Spre deosebire de levuri, dermatofiții cresc lent, astfel încât culturile trebuie urmărite timp mai îndelungat. În general, creșterea poate apărea în 6–15 zile, dar uneori este necesar un interval de 2–3 săptămâni pentru dezvoltarea suficientă a coloniilor. Acest aspect este foarte important, deoarece o cultură eliminată prea devreme poate duce la ratări diagnostice.



Figura 21. Cultură de fungi, *Trichophyton spp.*, pe mediu Sabouraud cu dextroză (SDA)

Examenul culturilor și identificarea dermatofiților

După apariția coloniilor, urmează examinarea lor macroscopică și microscopică. La nivel microscopic, în culturile de dermatofiți se pot evidenția două elemente de mare importanță: **macroconidiile** și **microconidiile**. Aceste structuri sporale au valoare diagnostică deosebită, deoarece forma, dimensiunea, numărul și modul lor de dispunere ajută la diferențierea genurilor și speciilor. Identificarea principalelor specii se face pe baza caracterelor culturale și morfologice. Genurile *Trichophyton* și *Microsporum* dezvoltă în general colonii alb-gălbui, cu aspect pufos și creștere relativ lentă. În schimb, genul *Epidermophyton* formează culturi cu creștere mai rapidă și colorație verde-maronie. Aceste caractere macroscopice, corelate cu aspectul microscopic al conidiilor, permit orientarea diagnosticului spre un anumit gen.



Trichophyton rubrum

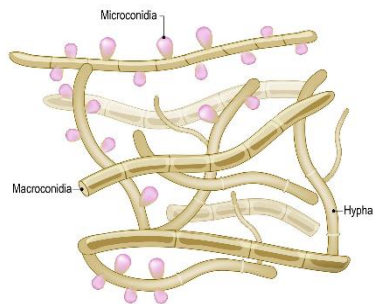


Figura 22. *Microsporium* – macroconidii mari, fusiforme, septate, *Epidermophyton* – macroconidii clavate, netede, fără microconidii, *Trichophyton rubrum* – hife septate, microconidii numeroase dispuse de-a lungul hifelor, macroconidii rare și alungite.

Sensibilitatea la antifungice

După identificarea fungului, se poate aprecia sensibilitatea acestuia la antifungice. Dermatofiiți sunt în general sensibili la derivați de azoli, precum fluconazolul și ketoconazolul, dar și la griseofulvină, terbinafină și

amfotericina B. Cunoașterea sensibilității are importanță practică mai ales în formele cronice, extinse, recidivante sau în cazurile care răspund slab la tratamentul obișnuit. Terbinafina și griseofulvina sunt deosebit de importante în tratamentul dermatofitozelor, în special al celor care afectează pielea păroasă și unghiile, unde terapia trebuie să fie susținută și de lungă durată. Testarea sensibilității nu este necesară în toate cazurile, dar poate deveni utilă atunci când există suspiciunea de rezistență sau eșec terapeutic.

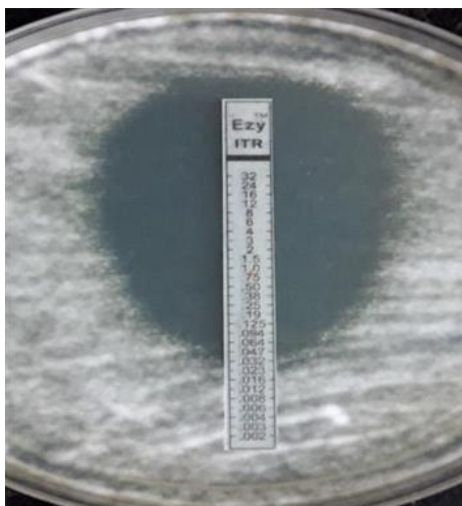


Figura 23. Metoda gradientului de difuzie (E-test). Banda marcată „ITR” conține un gradient de concentrație de itraconazol, iar zona de inhibiție a creșterii fungice este vizibilă sub forma unei arii clare, eliptice, în jurul benzii. Valoarea concentrației minime inhibitorii (CMI/MIC) se determină la punctul de intersecție dintre marginea zonei de inhibiție și scala de pe bandă.

Dermatofitozele

Dermatofitozele reprezintă infecții fungice superficiale produse de dermatofiți, fungi keratinofili care invadează structurile bogate în keratină, precum pielea, părul și unghiile. Printre cele mai frecvente forme clinice se numără *Tinea pedis* și *Tinea unguium* (onicomicoza), afecțiuni cu impact semnificativ asupra calității vieții pacientului și cu importanță majoră în practica diagnostică micologică.

Tinea pedis

Cunoscută și sub denumirea de „piciorul atletului”, este o dermatofitoză frecvent întâlnită, caracterizată prin descuamări multiple, pruriginoase, localizate în special în spațiile interdigitale ale piciorului, cel mai frecvent între degetele al treilea și al patrulea. Leziunile pot evolua prin extindere către suprafața plantară a degetelor și, uneori, a întregii plante.

Dezvoltarea acestei infecții este favorizată de condițiile de umiditate și căldură, specifice spațiilor interdigitale, mai ales în contextul purtării încălțămintei nepermeabile și a șosetelor care favorizează transpirația și împiedică evaporarea acesteia. Aceste condiții creează un mediu optim pentru proliferarea dermatofiților.

Transmiterea infecției se poate realiza atât direct, prin contactul cu persoane infectate, cât și indirect, prin intermediul obiectelor contaminate, precum încălțămintea, șosetele sau prosoapele. De asemenea, utilizarea în comun a spațiilor umede, cum sunt bazinele de înot, băile publice sau sălile de sport, contribuie semnificativ la răspândirea infecției, motiv pentru care această afecțiune este frecvent întâlnită la sportivi.

Tinea unguium (onicomicoza)

Cunoscută sub denumirea de onicomicoză, reprezintă infecția fungică a unghiilor și poate apărea ca manifestare izolată sau, mai frecvent, în asocieri cu alte dermatofitoze, precum *Tinea pedis*, *Tinea cruris* sau *Tinea corporis*.

Din punct de vedere etiologic, aproximativ 80% dintre cazuri sunt determinate de dermatofiți, în timp ce 5–17% sunt cauzate de levuri, iar un procent mai mic, de 1–5%, este atribuit fungilor nondematofiți. Dintre dermatofiți, *Trichophyton rubrum* este cel mai frecvent agent etiologic, responsabil pentru 70–85% dintre infecții, urmat de *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, implicat în aproximativ 15–20% din cazuri.

Epidermophyton floccosum este mai rar întâlnit, fiind responsabil pentru aproximativ 1–3% dintre infecții.

Clinic, onicomicoza se caracterizează prin modificări ale aspectului unghiei, care devine îngroșată, friabilă, decolorată și uneori deformată. Aceste modificări sunt consecința invaziei fungice și a distrugerii structurii keratinizate a unghiei.

Diagnosticul micologic al acestor infecții se bazează pe corelarea datelor clinice cu investigațiile de laborator, care includ recoltarea produsului patologic (scuame, fragmente unghiale), examenul microscopic direct și cultivarea pe medii speciale. Identificarea agentului etiologic este esențială pentru alegerea tratamentului adecvat, întrucât diferitele specii fungice pot prezenta sensibilitate variabilă la antifungice.

În cazul *Tinea pedis*, examenul microscopic poate evidenția hife septate, iar cultura permite identificarea genului și speciei implicate. În onicomicoză, diagnosticul este adesea mai dificil, datorită creșterii lente a fungilor și a posibilei contaminări, fiind necesară corelarea atentă a rezultatelor de laborator cu aspectul clinic.

Tinea corporis

Cunoscută și sub denumirea de „herpes circinat”, reprezintă dermatofitoza pielii glabre (fără păr terminal). Se manifestă prin leziuni eritemato-scuamoase, rotunde sau ovalare, bine delimitate, cu margini active, ușor reliefate și centru mai clar, ceea ce conferă aspectul caracteristic „în inel”.

Leziunile sunt frecvent pruriginoase și pot apărea pe trunchi, membre sau față. Evoluția este centrifugă, cu extindere periferică și vindecare centrală.

Transmiterea se realizează prin contact direct cu persoane sau animale infectate (zoofilie – frecvent pisici, câini), dar și indirect, prin obiecte contaminate (îmbrăcăminte, prosoape).

Tinea cruris

Cunoscută și sub numele de „eczema marginatum” sau „jock itch”, afectează regiunea inghinală, perineală și partea superioară a coapselor. Este mai frecventă la bărbați.

Clinic, se caracterizează prin plăci eritematoase bine delimitate, cu margini active, descuamative, pruriginoase, care pot prezenta extensie periferică. Zona centrală poate fi mai puțin inflamată.

Factorii favorizanți includ transpirația excesivă, obezitatea, igiena deficitară și purtarea hainelor strâmte sau sintetice. Infecția este adesea asociată cu Tinea pedis, fiind posibilă autoinocularea.

Tinea capitis

Reprezintă dermatofitoza scalpului, frecvent întâlnită la copii. Se manifestă prin plăci alopecice, descuamare, fire de păr fragile și rupte la nivelul scalpului.

În funcție de agentul etiologic și de răspunsul inflamator, pot apărea forme:

- neinflamatorii (cu descuamare fină),
- inflamatorii (kerion – leziuni dureroase, supurate).

Transmiterea este directă (de la persoane sau animale infectate) sau indirectă (prin piepteni, perii, pălării). Unele specii de *Microsporum* pot prezenta fluorescență la lampa Wood.

Tinea barbae

Afectează zona bărbii și a mustății, fiind mai frecventă la bărbații adulți.

Se caracterizează prin leziuni inflamatorii, noduli, pustule și uneori abcese la nivelul foliculilor pilosi, putând semăna cu foliculita bacteriană. Firele de păr devin fragile și pot fi ușor smulse.

Transmiterea este adesea zoonotică, prin contact cu animale infectate.

Tinea faciei

Dermatofitoză localizată la nivelul feței (excluzând barba). Se manifestă prin leziuni eritemato-scuamoase, uneori cu aspect inelar, dar adesea atipice.

Poate fi confundată cu dermatite sau lupus cutanat, mai ales dacă pacientul a utilizat corticosteroizi topici („tinea incognito”).

Tinea manuum

Afectează mâinile, frecvent unilateral. Se caracterizează prin descuamare difuză, hiperkeratoză și fisuri la nivel palmar.

Este frecvent asociată cu *Tinea pedis* („two feet–one hand syndrome”).

Tinea imbricata

Formă rară de dermatofitoză, cauzată de *Trichophyton concentricum*.

Se caracterizează prin leziuni concentrice, suprapuse, cu descuamare în cercuri multiple, conferind un aspect „în valuri” sau „în țigla”. Este endemică în anumite regiuni tropicale.

Diagnosticul de laborator în infecțiile produse de levuri

Diagnosticul micologic al infecțiilor produse de levuri, în special de speciile aparținând genului *Candida*, reprezintă un proces complex care implică mai multe etape succesive, având ca scop izolarea, identificarea și caracterizarea agentului etiologic. Acest demers este important pentru stabilirea unui tratament antifungic adecvat, în special în contextul creșterii incidenței infecțiilor oportuniste.

Speciile de *Candida* sunt microorganisme comensale, prezente în mod normal la nivelul mucoaselor umane și animale. În anumite condiții favorizante, acestea pot deveni patogene, determinând infecții de origine

endogenă. Dintre acestea, *Candida albicans* este responsabilă pentru aproximativ 70% dintre infecții, fiind urmată de alte specii precum *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* și *Candida famata*.

Un aspect important în diagnosticul de laborator îl reprezintă momentul recoltării probelor. În situația în care pacientul a urmat deja un tratament antifungic, se recomandă ca recoltarea produsului patologic să fie efectuată la cel puțin trei zile de la întreruperea acestuia, pentru a evita rezultate fals negative.

Recoltarea produsului patologic

Prima etapă a diagnosticului constă în recoltarea corectă a produselor patologice, care se realizează în funcție de localizarea infecției. Astfel, pot fi recoltate probe precum puroi, spută, secreții (otică, sinusală, vaginală, cervicală sau linguală), sânge sau lichid cefalorahidian. Este esențial ca aceste probe să fie transportate rapid către laborator, pentru a preveni multiplicarea necontrolată a levurilor sau degradarea materialului biologic.

În cazul produselor semi-lichide, cum sunt puroiul sau lichidele seroase, se utilizează medii speciale de transport, precum Portagerm sau Mycoline, care mențin viabilitatea microorganismelor până la prelucrarea acestora.

Mediul Portagerm este un mediu de transport utilizat pentru probele biologice, în special pentru cele semilichide sau fluide (puroi, secreții, lichide patologice). Acesta are rolul de a conserva microorganismele prezente în probă pe durata transportului către laborator, prevenind atât multiplicarea excesivă, cât și distrugerea acestora. Prin compoziția sa, Portagerm menține echilibrul microbiologic al probei și limitează contaminarea, fiind util în situațiile în care prelucrarea nu poate fi realizată imediat după recoltare.

Mediul Mycoline, în schimb, este un mediu selectiv destinat cultivării fungilor, inclusiv a speciilor de *Candida*. Acesta conține, pe lângă nutrienții necesari dezvoltării fungilor, substanțe selective precum antibiotice (de exemplu cloramfenicol) și agenți antifungici specifici (precum actidiona), care inhibă dezvoltarea bacteriilor și a anumitor funghi contaminanți. De asemenea, prezența unui indicator de pH (de exemplu roșu fenol) permite evidențierea modificărilor metabolice produse de levuri, facilitând diferențierea acestora.

Examenul microscopic direct

Examenul direct reprezintă o etapă rapidă și importantă, care permite evidențierea prezenței fungilor în produsul patologic. Preparatul nativ se realizează între lamă și lamelă, prin adăugarea unei soluții disociante, precum hidroxidul de potasiu (KOH) sau hidroxidul de sodiu (NaOH), în concentrații de 10–30%. Aceste soluții au rolul de a dizolva elementele celulare gazdă, facilitând observarea structurilor fungice.

După un interval de disociere de aproximativ 20–30 de minute (sau mai mult în cazul fragmentelor dure, cum sunt unghiile), preparatul este examinat microscopic. Se pot observa levuri sub formă de celule ovalare, cu dimensiuni de aproximativ 4–6 μm , uneori asociate cu pseudohife sau filamente miceliene, aspect sugestiv pentru infecțiile cu *Candida*.

Cultivarea fungilor

Cultivarea reprezintă etapa esențială pentru izolarea și dezvoltarea coloniilor fungice, fiind realizată pe medii selective. Cel mai frecvent utilizat este mediul Sabouraud, simplu sau suplimentat cu antibiotice (gentamicină, cloramfenicol) pentru inhibarea florei bacteriene. De asemenea, pot fi utilizate medii speciale precum Mycoline.

Însămânțarea trebuie efectuată rapid și în condiții aseptice, preferabil într-o hotă microbiologică, pentru a evita contaminarea. Ulterior, mediile sunt incubate la o temperatură de aproximativ 30°C, timp de 24–48 de ore. În aceste condiții, *Candida albicans* dezvoltă colonii caracteristice, de culoare albă, cu aspect cremos și margini regulate.

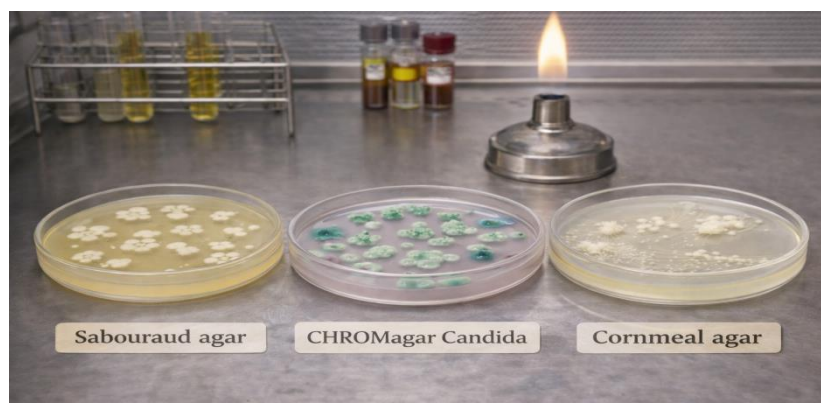


Figura 24. Cultură de *Candida albicans* pe Sabouraud (colonii cremoase), CHROMagar (colorație specifică) și Cornmeal (pseudohife și blastoconidii).

Identificarea

Identificarea precisă a speciilor implicate se realizează printr-o combinație de metode morfologice, de cultură și biochimice. Examinarea microscopică a frotiurilor colorate oferă informații despre morfologia celulară.

Un test specific pentru *Candida albicans* este testul de filamentare (Germ Tube Test), care permite diferențierea acestei specii de alte levuri în decurs de aproximativ două ore, prin evidențierea formării tubilor germinativi.

De asemenea, mediile cromogene (Chromagar) permit diferențierea speciilor pe baza culorii coloniilor după incubare:

Candida albicans formează colonii verzi,

Candida tropicalis colonii albastre metalice,

Candida krusei colonii roz.

Metodele moderne includ sisteme precum MiniAPI sau VITEK 2 Compact, care utilizează teste biochimice standardizate pentru identificarea rapidă și precisă a speciilor.



Figura 25. Test API – sistem de identificare bazat pe reacții biochimice, evidențiate prin modificări de culoare și interpretate prin cod numeric.

Testarea sensibilității la antifungice

Ultima etapă a diagnosticului constă în evaluarea sensibilității tulpinilor izolate la antifungice. Aceasta este esențială pentru alegerea terapiei optime, mai ales în cazul infecțiilor invazive sau recurente.

Testarea se poate realiza prin metode standardizate, inclusiv sisteme automate (VITEK 2) sau kituri comerciale, care determină susceptibilitatea la antifungice precum Amfotericina B, Fluconazol, Itraconazol sau Voriconazol.

Diagnosticul de laborator în infecțiile produse de mucegaiuri

Diagnosticul de laborator al infecțiilor produse de mucegaiuri, în special de speciile aparținând genului *Aspergillus*, reprezintă un proces complex care implică recoltarea adecvată a produselor patologice, examinarea microscopică, cultivarea și identificarea agentului etiologic.

Speciile implicate cel mai frecvent în patologia umană includ *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Aspergillus versicolor*.

Infecțiile produse de mucegaiuri din genul *Aspergillus* apar în principal prin pătrunderea sporilor în organism pe cale respiratorie, aceasta fiind cea mai frecventă modalitate de transmitere. Inhalarea conidiilor din aerul contaminat conduce la colonizarea căilor respiratorii, în special la nivelul bronhiilor și alveolelor pulmonare, putând evolua către forme invazive la pacienții imunocompromiși. Mai rar, infecția se poate produce prin inoculare directă la nivelul tegumentelor sau mucoaselor, în urma unor leziuni cutanate sau traumatisme, favorizând dezvoltarea infecțiilor locale sau diseminate.

Recoltarea produselor patologice

Prima etapă a diagnosticului constă în recoltarea corectă a probelor biologice, care trebuie realizată în funcție de localizarea infecției. În infecțiile respiratorii, cele mai frecvente probe sunt sputa și lichidul de spălătură bronho-alveolară, care permite evidențierea directă. În formele invazive sau diseminate, se pot recolta fragmente tisulare prin biopsie, sânge sau lichid cefalorahidian.

Recoltarea trebuie efectuată în condiții de asepsie riguroasă, iar probele trebuie transportate rapid la laborator pentru a preveni contaminarea sau degradarea acestora. În cazul fragmentelor tisulare, manipularea atentă este importantă pentru a menține integritatea elementelor fungice.

Examenul microscopic direct

Examinarea microscopică directă oferă informații rapide privind prezența fungilor filamentați. Preparatele se realizează prin tehnica lamă-lamelă, utilizând soluții disociante precum KOH 10–20%, care clarifică materialul biologic și evidențiază structurile fungice.

La microscop se observă hife septate, ramificate dicotomic, caracteristice genului *Aspergillus*.

Cultivarea

Cultivarea reprezintă etapa esențială pentru izolarea și identificarea mucegaiurilor. Speciile de *Aspergillus* cresc pe medii uzuale pentru fungi, precum mediul Sabouraud, de obicei fără cicloheximidă, deoarece unele specii pot fi inhibitate de aceasta.

Însămânțarea se realizează în condiții sterile, iar mediile sunt incubate la aproximativ 30°C. Timpul de creștere variază în funcție de specie:

Aspergillus fumigatus dezvoltă colonii în aproximativ 2–3 zile, *Aspergillus flavus* necesită aproximativ 5–7 zile, alte specii pot avea timpi variabili de dezvoltare.

Coloniile prezintă caracteristici macroscopice distincte, utile în identificare:

- *A. fumigatus* formează colonii de culoare verde-închis,
- *A. flavus* prezintă colonii galben-verzui, cu revers roșu-brun,
- *A. niger* dezvoltă colonii inițial alb-gălbui, care devin ulterior negre.

Aceste caracteristici culturale constituie un criteriu important în diagnosticul diferențial.



Figura 26 Colonii de *Aspergillus*:

A. fumigatus – verde-gri;

A. flavus – galben-verzui;

A. niger – negru.

Identificarea speciilor de mucegaiuri

Identificarea se bazează pe corelarea caracterelor macroscopice ale coloniilor cu aspectele microscopice. Examinarea microscopică a culturilor evidențiază structuri caracteristice precum conidioforii, veziculele și lanțurile de conidii. Pentru genul *Aspergillus*, identificarea se realizează prin observarea, formei și dimensiunii conidioforilor, prezenței veziculelor terminale, modului de dispunere a fialidelor și conidiilor.

În laborator, se pot utiliza și metode suplimentare, precum teste biochimice sau metode moleculare, în special în cazurile dificile sau invazive.

BIBLIOGRAFIE:

1. Apurba SS, Sandhya BK. Review of Microbiology & Immunology. 6th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2018.
2. Babalska ZŁ, Korbecka-Paczkowska M, Karpiński TM. Wound antiseptics and European guidelines for antiseptic application in wound treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(12):1253. doi:10.3390/ph14121253. PMID: 34959654; PMCID: PMC8708894.
3. Babiker A, Kadri SS. ICU management of invasive β -hemolytic streptococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2022;36:861–887.
4. Baron S, Washington JA. Principles of Diagnosis. In: *Medical Microbiology*. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
5. Bednarek RS, Nassereddin A, Ramsey ML. Skin antiseptics. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29939630.
6. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, et al. Evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*. 2020;34:100622.
7. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, et al. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:208–236.
8. Choudhry P. High-throughput method for automated colony and cell counting by digital image analysis. *PLoS One*. 2016;11(2).
9. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J*. 2013;10 Suppl 1:9–14. doi:10.1111/iwj.12175. PMCID: PMC7950476.
10. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP. Hugo and Russell's *Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. 2004.
11. Erkmen O. Direct microscopic count techniques. In: *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. 2022. p. 19–30.
12. González LL, Gutiérrez Pérez MI, Lucio-Villegas ME, Cachafeiro SP. Introducción a los antisépticos. *Aten Primaria*. 2014;46 Suppl 2:1–9. PMCID: PMC8171426.
13. Haynes A, Wax PM. Antiseptics, disinfectants and sterilants. In: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 11th ed. McGraw-Hill; 2019.
14. Heuser E, Becker K, Idelevich EA. Evaluation of an automated system for counting microbial colonies. *ASM*. 2013;11(4).

15. Kar A. *Pharmaceutical Microbiology*. New Age International Publishers; 2008.
16. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, et al. Strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:208–236.
17. Link T. Guideline implementation: sterilization. *AORN J*. 2019;109(6):772–782. doi:10.1002/aorn.12668.
18. Licker M, Hogeia E, Crăciunescu M, et al. *Microbiologie generală – Îndreptar de lucrări practice*. Timișoara: Editura Victor Babeș; 2019.
19. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Saunders Elsevier; 2015.
20. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147–179.
21. Moshtaq Talip A-M. *Sterilisation and Disinfection*. University of Al-Qadisiyah; 2016.
22. Murphy EC, Friedman AJ. Hydrogen peroxide and cutaneous biology: translational applications. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(6):1379–1386.
23. Panta G, Richardson AK, Shaw IC. Effectiveness of autoclaving in sterilizing reusable medical devices. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(10):858–864.
24. Rodríguez-Frías F, Quer J, Tabernero D, et al. Microorganisms as shapers of human civilization. *Microorganisms*. 2021;9:2518.
25. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization: an overview. *Am J Infect Control*. 2013;41(5 Suppl).
26. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection, sterilization and control of hospital waste. In: *Mandell's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2015.
27. Sandle T. Selection and application of culture media. In: *Biocontamination Control*. 2019. p. 103–123.
28. Sizar O, Leslie SW, Unakal CG. *Gram-positive bacteria*. National Library of Medicine; 2023.
29. Torok E, Moran E, Cooke F. *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*. 2nd ed. Oxford University Press; 2017.
30. Yoo JH. Review of disinfection and sterilization – Back to basics. *Infect Chemother*. 2018;50(2):101–109.