

- antibiotice care inhibă sinteza acizilor nucleici (rifampicina, ac.nalidixic, nitrofurantoinle).

Antibiograma este o tehnică de laborator care permite măsurarea "in vitro" a sensibilității unei bacterii la unul sau mai mulți agenți antimicrobieni. Rezultatele testului permit selecționarea antibioticului care manifestă activitatea cea mai intensă și care urmează a fi administrat pacientului pentru obținerea unui efect terapeutic maxim.

Există două tehnici principale: tehnica prin diluții și tehnica discurilor.

Tehnica prin diluții este folosită numai în cazuri speciale.

Tehnica discurilor este mai simplă și de aceea este utilizată în mod curent. Ea are avantajul că permite testarea concomitentă a mai multor antibiotice.

Metoda antibiogrammei cu discuri constă în însămânțarea pe geloză nutritivă dintr-o placă Petri a speciei bacteriene pe care dorim să o testăm. După uscarea gelozei, se pun discurile cu antibiotice și se lasă 18 h la termostat. La periferia discurilor ce conțin antibiotice active apare o zonă în care cultura este absentă (bacterie sensibilă). Cultura nu este împiedicată să se dezvolte în jurul discurilor cu antibiotice inactive (bacterie rezistentă).

Cap.V. CULTIVAREA BACTERIILOR

I. MEDIILE DE CULTURĂ

Pentru identificarea unei specii bacteriene, examenul microscopic direct al produsului patologic recoltat de la bolnav este de cele mai multe ori insuficient. Precizarea cauzei care a produs boala necesită cultivarea agentului patogen pe un complex de substanțe nutritive adecvate care alcătuiesc *mediile de cultură*.

Aceste medii de cultură, pentru a fi corespunzătoare, trebuie să îndeplinească câteva condiții: să conțină *substanțe plastice și energetice* necesare cultivării microbului însămânțat, adică să asigure surse de azot, de hidrați de carbon, de săruri minerale, de apă, de vitamine și factori de creștere necesari dezvoltării și reproducerii celulelor bacteriene, să *satisfacă cerințele de aerobioză sau anaerobioză* ale agentului ținând cont de faptul că, în timp ce bacteriile aerobe pot folosi oxigenul molecular, cele anaerobe nu se pot dezvolta în prezența oxigenului liber, să aibă o *concentrație de ioni de hidrogen (pH)* optimă și să fie sterile, pentru a permite izolarea în cultură pură a germeniului respectiv.

Pe măsura cunoașterii tot mai aprofundate a exigențelor unei bacterii s-a ajuns la realizarea unor medii de cultură cu o compoziție adecvată și precisă. În unele cazuri s-a ajuns chiar la situația optimă de preparare a unor medii sintetice-standardizate, nemaifiind necesare ingrediente de origine animală sau vegetală a căror compoziție poate varia foarte mult.

În general, mediile de cultură se pot prezenta sub formă lichidă (bulion, apă peptonată etc.) sau solidă (medii în care se incorporează agar).

În funcție de scopul urmărit, mediile de cultură pot fi grupate astfel:

- medii de izolare, care permit izolarea bacteriei dintr-un produs patologic;
- medii de transport, care permit supraviețuirea anumitor bacterii ce nu pot fi însămânțate imediat după recoltare (de exemplu, mediul Stuart pentru Neisserii, Carry-Blair pentru vibrii holerice etc.);

Carry-Blair pentru vibrii holerice etc.);

- medii de îmbogățire, destinate cultivării unor bacterii cu necesități nutritive particulare și care sunt stimulate să crească în mod special, deoarece numărul lor este redus în produsul patologic în momentul recoltării (de exemplu, bulion cu selenit și mediul Müller-Kauffmann pentru salmonelle);

- medii selective, care conțin elemente ce permit creșterea numai a anumitor bacterii dintr-un produs (de exemplu, mediul Wilson-Blair pentru bacilul tific);

- medii diferențiale, care conțin substanțe ce pun în evidență unele proprietăți biochimice ale bacteriilor studiate. La rândul lor, mediile diferențiale pot fi simple (de exemplu, mediul AABTL care pune în evidență fermentarea lactozei) sau politrope (de exemplu, mediul TSI care pune în evidență mai multe caractere biochimice).

În tehnica preparării unui mediu nutritiv trebuie să se aibă în vedere următoarele:

- spălarea și pregătirea corespunzătoare a recipientelor în care se vor prelucra și repartiza mediile;

- trebuie ca mediile să fie clare, pentru a se putea urmări aspectul culturii în mediile lichide (modul de tulburare a bulionului) sau morfologia coloniilor pe mediile solide; clarificarea se obține prin-o filtrare corectă;

- substanțele organice care intră în compoziția mediului trebuie să aibă calități nutritive optime și să nu fie degradate prin tratament chimic sau termic excesiv. Altfel, substratul respectiv devine necorespunzător.

La baza mediilor de cultură de origine animală, *maceratul de carne* este componentul principal. Carne folosită la prepararea acestuia trebuie să provină de la vite sănătoase. Maceratul de carne se prepară astfel:

- carnea proaspătă de vită sau de cal se curăță de tendoane, aponevroze și de grăsimi și se trece prin mașina de tocat. La 1 000 g tocătură se adaugă 2 000 ml apă de robinet și se ține 24 ore la rece (vara la frigider), după care se fierbe 30 min., amestecând cu o lopăță de lemn. Se filtrează apoi prin tifon. Se completează cu apă distilată la volumul inițial.

Maceratul nu se folosește ca atare, ci servește la prepararea altor medii. Dacă se folosește imediat, nu se sterilizează. Dacă se păstrează în depozit, atunci se sterilizează 30 min. la 120°C.

Bulionul simplu se prepară astfel: la 1 000 ml macerat se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare și se încălzește până la fierbere. Se ajustează pH-ul la 8, folosind o soluție de hidroxid de sodiu 10%, după care se sterilizează 30 min. la 120°C pentru precipitarea sărurilor alcalinoteroase. Pentru îndepărtarea precipitatului, mediul se filtrează la cald prin hârtie de filtru și se repartizează bulionul obținut în recipiente adecvate întrebuințării (eprobete sau flacoane) și se sterilizează din nou 30 min., dar la 115°C, pentru a nu precipita alte săruri din soluție.

La fiecare sterilizare, pH-ul mediului scade cu valori de 0,2.

Maceratul de carne poate fi utilizat și la prepararea *gelozei simple*. Geloza sau agarul se extrage dintr-o algă, este lipsită de substanțe nutritive și servește numai la solidificarea mediului. Rămâne solid la 37°C, permițând obținerea de colonii microbiene izolate. Se topește la 80°C, rămâne în stare lichidă până la 45°C și se solidifică la 40°C.

La 1 000 ml macerat de carne se adaugă 10 g peptonă, 5 g sare, se dizolvă la cald și se adaugă apoi 20 g geloză spălată. Pentru spălare, geloză fibre împăturită într-un fierbere, agităndu-se până la completa topire a agarului. Se completează la volumul inițial cu apă distilată, se ajustează pH-ul la 8, se sterilizează 30 min. la 120°C, după care se filtrează la cald prin hârtie de filtru. Se repartizează în recipiente adecvate și eprubete și se sterilizează din nou 30 min. la 115°C. După sterilizare, geloză din eprubete poate fi solidificată în poziție verticală sau prin înclinare.

Bulionul simplu și geloză nutritivă simplă se utilizează ca mediu de bază pentru prepararea unor medii mai complexe sau ca atare pentru cultivarea germinilor care nu au cerințe nutritive deosebite.

Apa peptonată simplă. Se prepară prin dizolvare la cald a 10 g peptonă și 5 g CINa în 1 000 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul la 7,6 cu soluție 10% de NaOH după care se autoclavează la 120°C timp de 30 min. pentru precipitare. Se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi sau baloane, după necesități și se sterilizează la 115°C timp de 20 min. - pH final 7,2-7,4.

Apa peptonată se utilizează fie ca mediu de bază pentru testele de fermentare ale zaharurilor și alcoolilor, fie pentru testele de producere de indol sau H₂S.

Geloza sânge. Se prepară din geloză nutritivă 2% lichidă și răcită la 45°C. La 9 ml geloză se adaugă 0,5-3 ml sânge defibrinat. Se utilizează pentru cultivarea unor germeni mai pretențioși (streptococ) sau pentru punerea în evidență a capacității de hemoliză a unora dintre aceștia (streptococ, stafilococ).

Mediul Veillon. Se prepară dintr-o geloză nutritivă 2% la care se adaugă glucoză în proporție de 1%. Se repartizează în tuburi, se sterilizează 30 min. la 110°C și se solidifică în poziție verticală - pH final 7,6. Este mediul cel mai simplu utilizat pentru izolarea germinilor anaerobi. Se însămânțează produsul patologic în profunzimea mediului lichid prin încălzire urmată de resolidificare prin răcire.

Mediul Sabouraud solid se prepară din 1 000 ml apă de robinet, 10 g peptonă, 20 g glucoză și 20 g agar fibre. Se dizolvă peptona în 250 ml apă la fierbere, se autoclavează 30 min. la 120°C și se filtrează. În alți 250 ml apă se dizolvă glucoza și se filtrează. Se amestecă cele două soluții filtrate, se completează cu apă până la 1 000 ml și se adaugă agarul spălat. Se fierbe până la topirea agarului, se filtrează prin tifon, se repartizează după necesități și se sterilizează la 110°C timp de 30 min. - pH final 5,8-6,2. Un mediu similar *lichid* se poate prepara din aceleași ingrediente minus agarul. Aceste medii se utilizează pentru izolarea și cultivare ciupercilor microscopice.

Stabilirea și corectarea pH-ului mediilor de cultură este de o importanță deosebită pentru cultivarea microorganismelor. Este cunoscut faptul că prin autoclavare pH-ul mediului scade. Pentru acest motiv sunt necesare operațiunile de control și corectare a pH-ului. Determinarea pH-ului se poate face prin metoda electrometrică cu ajutorul unui pHmetru, care este foarte precisă, dar când nu dispunem de aparatură necesară se poate utiliza metoda colorimetrică. Aceasta din urmă se bazează pe proprietatea unor substanțe numite indicatori, de a-și modifica culoarea sau nuanța în funcție de gradul de aciditate sau alcalinitate al soluției în care sunt dizolvate. Principiul metodei constă în compararea culorii soluției de cercetat în care s-a introdus un indicator, cu o serie de etaloane colorate.

Practic, aparatul este compus dintr-un comparator Walpole (stativ cu locuri pentru eprubete și orificii de observare prevăzute cu geam mat) și o scară de etaloane numită Scara Michaelis. Etaloanele sunt tuburi de sticlă care conțin soluții indicator. În locurile 1, 2 și 3 ale comparatorului Walpole se introduc tuburi de aceeași grosime cu tuburile etalon din Scara Michaelis. În tuburile 1 și 2 ale comparatorului se pun câte

2 ml mediu. În tubul 1 se mai pun 4 ml apă distilată și 1 ml metanitrofenol 0,3% iar în tubul 2 se adaugă numai 5 ml apă distilată. În tubul 3 se pun 7 ml apă distilată iar în tubul 4 se pune un tub etalon din Scara Michaelis. Privind apoi prin cele două orificii laterale, comparăm culoarea mediului cu indicator cu aceea a etalonului. Dacă nu se potrivește, se schimbă tubul etalon cu altul până când prin tuburile 1 și 3 vedem aceeași culoare ca și prin tuburile 2 și 4. Mediul cercetat are pH-ul care este scris pe tubul etalon respectiv.

În scop orientativ se poate utiliza metoda rapidă a hârtiei indicator care, umezită cu soluția de cercetat își modifică culoarea, după care este comparată cu o scară etalon colorată.

După verificarea pH-ului mediului de cultură, dacă este necesar se ajustează cu o soluție de NaOH sau HCl până la obținerea unui pH corespunzător.

2. ÎNSĂMÂNȚAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Scopul principal al oricărei examene microbiologice este acela de a identifica agentul etiologic al unei afecțiuni, pentru a se putea lua măsurile cele mai potrivite pentru tratarea și vindecarea bolnavului. Pentru aceasta este însă necesar ca, mai întâi, din produsele patologice recoltate în mod corect, să se obțină microbul în cultură pură. Multiplicarea și izolarea gemenilor respectiv este posibilă prin însămânțare pe medii de cultură adevărate, sau în special pentru virusuri, dar și pentru unele bacterii, prin inoculare în țesuturi vii (culturi de celule, ouă embrionate, animale de laborator susceptibile).

Însămânțarea sau inocularea prelevatelor aduse în laborator se face în mod adecvat și cu luarea unor măsuri speciale fie pentru evitarea contaminării personalului care efectuează operațiunea respectivă și care, mai ales în această fază de lucru când nu se cunoaște agentul patogen, trebuie să respecte cu strictețe normele de protecția muncii, dar mai ales pentru împiedicarea contaminării produsului patologic cu agenți microbieni din exterior care nu au nici o legătură cu boala și care pot falsifica rezultatele.

Însămânțarea produselor patologice se execută în camere de laborator (boxe) cu materialul steril (medii, plăci, tuburi, anse, pipete Pasteur sau gradate, tamponane etc.) în spațiile sterile din jurul flăcării becului de gaz, și cu recipiente cu substanțe dezinfectante (ex. amestec sulfo-cromic) și găleți de infecte la îndemână. În situații speciale când se bănuiește prezența în produsul patologic a unor agenți microbieni deosebiți de periculoși (HIV, virus rabic etc.) nu trebuie să lipsească masca, mănușile și ochelarii de protecție, iar manipularea produsului în cursul însămânțării sau inoculării se va face cu o grijă deosebită pentru a se evita accidentele care în aceste cazuri sunt de regulă fatale.

În general, însămânțarea se face fie cu ansa bacteriologică ce se sterilizează la flacăra în timpul lucrului, fie cu pipete Pasteur sau gradate ori cu tampon de vată montat pe o tijă, toate în prealabil sterilizate.

Tehnici curente de însămânțare a mediilor lichide sau solide Însămânțarea în medii lichide

Tehnica însămânțării cu ansa bacteriologică. Ansa cu firul însoțit în flacăra se introduce în recipientul ce conține prelevatul, se răcește alipind-o de perețele recipientului, apoi se ia o porțiune din produs. Se scoate dopul recipientului cu mediu în mediu din recipientul deschis sub protecția flăcării. Se descarcă ansa pe perețele recipientului, agitând ușor lichidul, se flambează din nou gura recipientului și dopul cu care apoi se astupă recipientul. După însămânțare, ansa se sterilizează din nou prin încălzire la roșu.

Tehnica însămânțării cu pipeta. Dacă se lucrează cu pipeta gradată, aceasta se scoate din ambalajul steril și se introduce rapid în flacăra atât capătul cât și toată lungimea ei. Se controlează apoi răcirea ei după flambar.

Dacă se lucrează cu pipeta Pasteur, se rupe vârful eșilat al pipetei, după care se flambează capătul.

Pipeta flambată și răcită se introduce în recipientul cu produsul prelevat și se aspiră de la câteva picături până la 1 sau mai mulți ml, în raport cu materialul de însămânțat și cantitatea de mediu de cultură. Pipeta trebuie manipulată cu grijă pentru a nu uda dopul de vată. Materialul aspirat în pipetă se însămânțează într-un recipient cu mediu nutritiv cu aceleași precauțiuni de flambar a gâtului recipientelor și a dopurilor respective.

Pipeta folosită se pune într-un pahar cu amestec sulfo-cromic, aspirându-se din amestec până la aproximativ 1 cm sub dop.

Tamponanele care au servit la recoltarea produselor patologice vor fi descărcate direct în mediu, după care vor fi reintroduse în tub și puse în găleata de infecte.

Însămânțări pe medii solide

Tehnica însămânțării în suprafață. Însămânțarea pe suprafața mediilor solide se poate face cu ansa, cu bagheta de sticlă îndoită în formă de L, cu tamponane, cu pipete etc. În cursul însămânțării se iau aceleași precauțiuni pentru păstrarea sterilității ca și la operațiunile de însămânțare în medii lichide.

Când se însămânțează medii care au fost solidificate în tuburi, în poziție înclinată, se execută pe suprafața mediului mișcări în zig-zag, de la bază către exterior, cu precauția de a nu zgăria suprafața mediului.

În cazul mediilor solidificate în coloană dreaptă, însămânțarea se face prin înțepare în profunzime.

În plăci Petri, în care s-a turnat un strat de mediu gelozat, însămânțarea se poate face cu ansa, cu bagheta de sticlă sau cu tamponul de recoltare. Placa se ține în apropierea flăcării iar operațiunea de însămânțare trebuie executată rapid pentru a se evita pătrunderea altor microorganisme din exterior.

Tehnica însămânțării prin incorporare. Se lichează mediul prin încălzire la $+80^{\circ}\text{C}$, se răcește la $+50^{\circ}\text{C}$ și se introduce produsul de însămânțat cu o pipetă sterilă. Se omogenizează prin ușoară rotire a recipientului. Mediul astfel însămânțat se toarnă, după caz, în plăci Petri sterile, sau se lasă ca atare în recipientul în care s-a făcut însămânțarea.

Tehnici de însămânțare cu izolarea agentului microbian în cultură pură

Aceasta urmărește obținerea dintr-un produs bacterian, în general cu conținut polimicrobian, a agentului etiologic, izolat în cultură pură. Debarasarea de celelalte specii microbiene de balast care alcătuiesc flora de asociație se realizează prin diferite metode care pot acționa fie direct asupra florei de asociație, inhibând-o în dezvoltarea ei, fie indirect, acționând asupra germinului pe care dorim să-l izolăm, favorizându-i acestuia, în mod cu totul preferențial, dezvoltarea.

Tehnicile de izolare în cultură pură pot fi generale sau speciale.

Tehnicile generale mai frecvent utilizate sunt de diluții succesive în medii lichide sau de epuizare pe medii solide.

Tehnica diluțiilor succesive în medii lichide. În acest scop se utilizează un șir de eprubete cu aceeași cantitate de mediu lichid. Se introduce, cu o pipetă, o picătură din amestecul de germeni în primul tub. Se agită conținutul eprubetei. Apoi, schimbându-se pentru fiecare eprubetă pipetele, se trece succesiv dintr-o eprubetă în cealaltă câte o picătură.

Această tehnică se completează cu efectuarea de treceri pe medii solide: din fiecare tub însămânțat se trece, de fiecare dată cu o altă pipetă, câte o picătură, pe câte un tub sau o placă cu geloză.

Această tehnică a diluțiilor succesive se poate face și în lichidul de condensare al mediilor solide, urmând aceeași metodologie.

Tehnica epuizării ansei pe medii solide se realizează prin însămânțări cu ansa bacteriologică, încărcată o singură dată cu amestecul de germeni, într-un șir de eprubete cu geloză înclinată, fără a steriliza sau a reîncărca ansa bacteriologică pe parcurs. Astfel se epuizează conținutul ansei și, în final, se ajunge să se însămânțeze numai câteva celule microbiene într-un tub care prin incubare la temperatură vor da naștere la colonii microbiene izolate. O astfel de colonie izolată trecută (replicată) pe un alt tub cu mediu, după incubare dă naștere la o cultură pură.

Tehnica diseminării (dispersiei) cu ansa pe medii solide. Cu ansa bacteriologică încărcată cu produsul patologic se descriu pe suprafața unui mediu solid, turnat într-o placă Petri, niște striuri paralele. După descrierea fiecărui grup de strii uni paralele, ansa bacteriologică va fi sterilizată prin încălzire la incandescență și nu va fi încărcată striurile precedente, ansa este reîncărcată cu o cantitate de inocul, dar o cantitate din ce în ce mai mică, până ce se va ajunge la câteva celule microbiene izolate ce vor fi diseminate pe placă și vor da naștere la colonii microbiene izolate.

Tehnici speciale de izolare. Sunt utilizate când urmăm izolarea anumitor specii bacteriene dintr-un produs polimicrobian. Ele se realizează cu diverse mijloace fizice, chimice sau biologice. Dintre mijloacele fizice, de izolare, menționăm încălzirea la 80°C a amestecului de germeni, care se practică pentru a izola gemenii sporulați de formele vegetative de microbi. De asemenea, filtrarea printr-un filtru bacteriologic permitte izolarea unui virus ce străbate porii filtrului, dintr-un amestec cu bacterii ce sunt reținute de acesta.

Ca metode chimice menționăm: *metode de cultură selective* care conțin un agent inhibitor pentru flora de asociație (mediul Löwenstein care conține verde malachit inhibă flora de asociație și permite izolarea b. Koch); *metode electice* care conțin un substrat nutritiv ce, convenind preferențial speciei pe care dorim să o izolăm, permite dezvoltarea sa mai rapidă (mediul Löffler electiv pentru bacilul difteric) și *metode diferențiale* care permit relevarea unor caractere enzimatic proprii germinilor vizati de a fi izolați din amestec (mediul Istrati-Meier utilizat în izolarea dintr-o coprocultură a unor enterobacterii lactozo pozitive sau negative).

Ca metode biologice de izolare menționăm *metoda de însămânțare pe medii cu agenți biologici selectivi*, deci utilizarea de medii selective pe bază de antibiotice (mediul selectiv LCN pentru izolarea meningococului care conține Lincomicină, Colimicină și Nistatin), și *utilizarea unor animale de laborator* pentru izolarea unor specii bacteriene dintr-un amestec – de exemplu, inocularea subcutanată a șoarecelui alb cu o spuță în care se găsește un pneumococ. După 1-4 zile de la inoculare, șoarecele face o infecție septicemică letală cu pneumococ, putându-se izola în cultură pură acest germeni din sânge. Un alt exemplu îl constituie inocularea subcutanată la un cobai a unui produs patologic în care se găsește b. Koch. Din viscerele acestui cobai după un interval variabil de timp, 1-6 luni, se va putea izola, în cultură pură bacilul Koch.

Metoda izolării unui singur microb prin *micromanipulare* se poate realiza cu ajutorul unui micromanipulator, a unei aparaturi speciale și a unor microinstrumente (pipete, anse, pense, seringi etc.) dar metoda nu este de uz curent ea fiind utilizată exclusiv în scop de cercetare.

Cap. VI. STERILIZAREA ȘI DEZINFECȚIA

1. STERILIZAREA

Este procedeul prin care se obține distrugerea tuturor microorganismelor saprofite sau patogene, fie că sunt în stare vegetativă fie că sunt sporulate.

Principalii agenți fizici utilizați pentru realizarea sterilizării sunt: căldura, filtrarea, centrifugarea, radiațiile ultraviolete și, mai rar, ultrasunetele.

1.1. STERILIZAREA PRIN CALDURĂ

Căldura folosită pentru sterilizare poate fi uscată sau umedă.

Sterilizarea prin căldură uscată

Încălzirea la roșu este folosită mai ales pentru sterilizarea ansei înainte și după întrebuintare și constă din încălzirea firului de platină, până capătă culoarea roșie, la flacăra unui bec de gaz sau la flacăra unei lămpi cu alcool.

Flambarea constă din trecerea rapidă prin flacăra a unui obiect (pipetă, gățul flacoanelor sau al eprubetelor, al băghetelor, lame, spatule etc.), în scopul de a distruge microorganismele existente pe suprafața acestora.

Sterilizarea în cuptorul cu aer cald (pupinel). Acest procedeu se utilizează, în special, pentru sterilizarea sticlăriei de laborator (eprubete, pahare, cutii Petri, pipete, baloane de sticlă, seringi Luer etc.), a cutiilor cu instrumente metalice, tamponare de vată pentru recoltarea exsudatului faringian etc.

Materialele pregătite pentru sterilizare, puse în coșurile metalice, sunt depuse pe rafturile cuptorului, fără a fi sprijinite de pereții acestuia. Se închide ușa aparatului, se aprinde sursa de căldură și se urmărește cu atenție termometrul pentru atingerea temperaturii de 180°C și menținerea ei la acest nivel timp de o oră. După acest timp se interzice sistemul de încălzire și se așteaptă scăderea temperaturii din cuptor fără a deschide ușa, deoarece răcirea bruscă poate provoca spargerea sticlăriei. Materialele astfel sterilizate se depozitează în sertare și dulapuri până la utilizarea lor.

Sterilizarea prin căldură umedă

Sterilizarea prin căldură umedă se face prin mai multe procedee: fierbere, vaporii de apă sub presiune, vaporii de apă la 100°C , pasteurizare, tindalizare.

Fierberea în apă este utilizată mai ales pentru sterilizarea seringilor, a fierbătorilor metalice și a tuburilor de cauciuc. Pentru aceasta se folosește un încălzitor electric sau cu flacăra până la punctul de fierbere și menținută astfel timp de 30 min.

Fierberea distruge formele vegetative ale bacteriilor, virusurile și unii spori (tetanos, cărbune etc.).

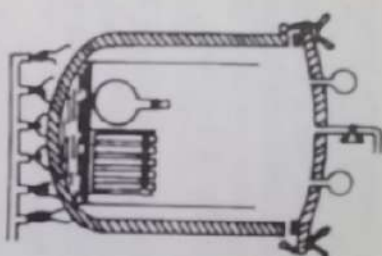


Fig. 11. Secțiune prin autoclav.

Sterilizarea cu vaporii de apă sub presiune se realizează în autoclavă. Cu ajutorul acestui procedeu se poate realiza o sterilizare completă prin distrugerea tuturor microorganismelor și a sporilor, cu condiția să se ridice temperatura la 120°C , timp de o jumătate de oră.

Autoclava funcționează astfel: se pune apă în cazanul aparatului până aproape de suportul pe care se așază coșulețele cu materiale, se introduc în cazan materialele de sterilizat (baloane cu medii de cultură, apă distilată, soluție salină fiziologică, dopuri și tuburi de cauciuc, pânzi, aparate de sângerat, filtre, casolete, găleți cu materiale infecte etc.) și se acoperă cu o coală de hârtie pentru a se evita umezirea lor cu apă rezultată din condensarea vaporilor. Se închide capacul și se fixează buloanele, două câte două, în diagonală, se deschide robinetul de vaporii, se aprind becurile de gaz și, când vaporii ies în jet continuu, se închide robinetul de vaporii. Din acest moment, manometrul începe să înregistreze ridicarea presiunii și, prin urmare, și creșterea temperaturii (la $1/2$ at corespunde o temperatură de 115°C , la 1 at corespund 120°C , iar la 2 at, 134°C). Când s-a atins presiunea corespunzătoare temperaturii dorite se reglează flacăra, pentru a se asigura menținerea acestei temperaturi un anumit timp (de exemplu, 20-30 min. la 120°C).

După terminarea sterilizării se sting becurile de gaz și se așteaptă până ce acul manometrului revine la 0. Se deschide apoi robinetul de vaporii și se desfac buloanele, pentru a se putea deschide capacul și a scoate materialele din interior. Dacă nu se respectă aceste reguli, se pot întâmpla accidente. Decompresia bruscă provoacă aruncarea dopurilor și proiectarea lichidelor din recipiente.

Controlul funcționării corecte a autoclavei se poate efectua în mai multe moduri. Temperatura din interior se poate controla cu un termometru special sau cu substanțe chimice sub formă de pulbere cu punct de topire cunoscut (benzonafiolul se topește la 110°C , sulful la 115°C , acidul benzoic la 121°C).

În aceste pulberi se pot incorpora urme de violet de gențiană, care colorează vizibil substanța topită. Testele chimice au dezavantajul că nu indică decât atingerea unei anumite temperaturi, fără a arăta durata acesteia. Pentru acest motiv s-a recurs la testele biologice, care constau din introducerea în autoclavă a unor culturi sporulate, rezistente la temperaturi înalte. Sterilizarea este eficientă dacă sporii sunt omorâți prin autoclavare; ei nu se mai dezvoltă dacă sunt înșălămați într-un mediu de cultură adecvat.

Sterilizarea cu vaporii la 100°C se realizează cu ajutorul autoclavei, dar robinetul de vaporii rămâne deschis tot timpul sterilizării. Prin această metodă se sterilizează produsele care nu suportă temperaturi mai mari de 100°C .

Pasteurizarea este o metodă de sterilizare parțială; prin ea se distrug numai formele vegetative, deoarece utilizează temperaturi puțin ridicate și de scurtă durată: 65°C timp de 30 min, 80-90°C timp de 1-2 min. sau 91-95°C timp de câteva secunde. Scăderea temperaturii se face brusc. Acest procedeu se folosește la sterilizarea laptelui și a unor medii de cultură, când se urmărește distrugerea formelor vegetative ale germinilor patogeni, fără a provoca însă alterarea vitaminelor, a enzimelor, a proteinelor etc. din produsele sau mediile respective.

Tindalizarea constă din încălzirea produsului supus sterilizării, timp de 60 min, la 60-65°C, trei zile consecutiv. Încălzirea repetată duce la distrugerea formelor vegetative și degradarea treptată a formelor sporulate. Prin această metodă se sterilizează produsele biologice care nu suportă temperaturi mai ridicate.

1.2. STERILIZAREA PRIN FILTRARE

Este operația de trecere a unui lichid printr-o substanță poroasă care reține microorganismele. Metoda se aplică la sterilizarea serului, a ascitei, precum și a unor medii de cultură care conțin diverse lichide organice ușor alterabile sub influența căldurii. Se cunosc mai multe feluri de filtre:

Filtrele Seitz utilizează plăci de azbest (1) care se fixează într-o armătură metalică (2). Filtrelor EK₁ reține bacteriile și lasă să treacă virusurile, iar filtrelor EK₂ reține virusurile de dimensiuni mai mari.

Armătura metalică, prevăzută cu o pâlnie (3), se montează prin intermediul unui dop de cauciuc (4) la un balon Kitasato (5). Filtrelor astfel montate și sterilizate poate fi utilizat. Tubul lateral al balonului (6) este pus în legătură cu o pompă de vid, iar placa de azbest este umezită cu apă distilată sterilă înainte de începerea operațiunii de filtrare. Lichidul filtrat trece în balonul de sticlă, datorită vidului ce s-a creat în acesta.

Filtrele de sticlă (Schott) au diferite porozități: G₁-G₅.

Filtrelor G₅ reține bacteriile. Pentru a fi utilizate, ele se montează la balane Kitasato. După fiecare utilizare este necesar ca filtrele de sticlă să fie fierte în apă distilată și spălate abundant, prin trecerea unei mari cantități de apă distilată prin ele.

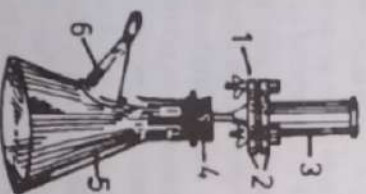


Fig. 12. Filtrelor Seitz.

1.3. STERILIZAREA CU RAZE ULTRAVIOLETE

Radiatiile ultraviolete sunt emise de lămpi speciale bactericide. Ele se folosesc, în general, pentru sterilizarea camerelor, a boxelor, a nișelor și a meselor de laborator. Nu este indicat să se lucreze sub lămpi aprinse. Când este totuși necesar să se lucreze astfel, se vor utiliza ochelari de protecție.

2. DEZINFECȚIA

Este un procedeu prin care se distrug microorganismele patogene, fără a fi necesară distrugerea germinilor saprofiti. În practică, totuși, tehnicile de dezinfecție, care folosesc în general substanțe chimice dezinfectante, realizează cel mai adesea o sterilizare.

În laboratorul de microbiologie sunt folosite o serie de substanțe chimice pentru dezinfecția mâinilor, a meselor, a dușurilor, a cuștilor de animale, precum și pentru dezinfecția unor produse patologice (sputa, fecalele etc.).

Substanțele dezinfectante au o toxicitate ridicată, ceea ce contraindică aplicarea lor pe țesuturi vii. Ele se aplică numai pe substraturi inerte în scopul distrugerii microorganismelor patogene.

Spre deosebire de acestea, *antisepticele* sunt substanțe chimice cu acțiune antimicrobiană care au o toxicitate relativ redusă, fapt ce permite aplicarea locală externă a acestora pe țesuturile vii, în scopul de a împiedica producerea sau extinderea unei infecții.

Un dezinfectant bun trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să acționeze asupra unui număr cât mai mare de agenți patogeni;
- să producă inactivarea ireversibilă a germinilor într-un timp cât mai scurt și să acționeze cât mai independent de condițiile mediului în care se desfășoară activitatea sa,
- să fie cât mai puțin toxic pentru om și pentru animale, să nu aibă miros neplăcut și să nu degradeze țesuturile, pielea, metalele, lemnul și alte materiale supuse dezinfecției;
- să fie cât mai stabil și să-și păstreze calitățile cât mai mult timp în condiții obișnuite;

- să fie ușor de manevrat și cât mai ieftin și să nu fie inflamabil sau explozibil. În laboratoarele de microbiologie sunt folosite mai multe substanțe dezinfectante. *Mertiolatul de sodiu* are o toxicitate redusă pentru om și pentru animale. În soluție de 1/2000 este utilizat pentru dezinfecția mâinilor, a instrumentelor contaminate, a obiectelor de piele și de cauciuc.

Formolul este soluția de aldehidă formică 40% în apă. Are o acțiune toxică puternică asupra bacteriilor - forme vegetative sau sporulate - și asupra virusurilor. Formolul poate fi utilizat atât sub formă de vapor, cât și sub formă lichidă, sub formă de aerosoli se folosește la dezinfecția camerelor. În mod obișnuit, pentru 1 m³ sunt necesari 6-10 ml formol comercial 40%. Când dezinfecția privește distrugerea unor germeni mai rezistenți, cantitatea de formol trebuie crescută. În cazul b. Koch sunt necesari 200 ml formol la 1 m³.

Vaporizarea formolului se face cu ajutorul autoclavei sau al unor aparate speciale. În prealabil, o parte formol comercial este diluată în 2-4 părți apă. Camerele supuse dezinfecției sunt închise ermetic, prin lipirea unor benzi de hârtie peste toate

comunicațiile cu exteriorul. După vaporizarea formolului, camerele rămân închise cel puțin 6-8 h, după care trebuie bine aerisite.

Formolul, sub formă de soluție, este răspândit prin stropire, pulverizare cu vermorelul sau prin îmbibare. Soluția de lucru se obține amestecând o parte formol comercial (40%) cu 19 părți apă. Pentru dezinfectarea unor suprafețe de ciment, faianță, sticlă sunt necesari 30-40 ml soluție pe metru pătrat. Pentru alte materiale, cantitatea de soluție este mai mare.

Formolul este utilizat și la prepararea și conservarea unor vaccinuri și a unor produse de diagnostic microbiologic.

Alcoolul etilic (spirtul) este un dezinfectant utilizat frecvent în laborator. Alcoolul dublu rafinat (96° alcoolic) are o acțiune dezinfectantă slabă, deoarece coagulează rapid albuminele din mediu, care formează astfel un strat protector pentru bacterii. Alcoolul de 70° este mult mai eficient, deoarece acționează mai lent, dar mai profund. În laborator alcoolul este utilizat la dezinfecția mâinilor, a unor instrumente etc. Alcoolul de 70° se obține din 1000 ml alcool 96° + 400 ml apă distilată.

Alcoolul metilic este toxic pentru om și are o acțiune dezinfectantă mai slabă, motive pentru care nu este folosit în mod curent pentru dezinfecție.

Alcoolul sau spirtul sanitar este un produs numai pentru uz extern.

Glicerina (alcoolul propilic) este un lichid vâcos, care se amestecă bine cu apa; se utilizează pentru distrugerea unor bacterii. Glicerina conservă unele virusuri.

Fenolul (acidul fenic, acidul carolic cristalizat, hidroxibenzenul) în stare pură este format din cristale incolor, care devin roșiatice în contact cu aerul, din cauza oxidării. Se păstrează în vase de culoare închisă. În concentrație de 3-5% omorâă microbi în 30-90 min.

Puterea dezinfectantă a unor substanțe chimice se exprimă în comparație cu cea a fenolului, stabilindu-se "indicele fenolic".

Crezolii (metilfenolii) se prezintă sub formă lichidă. Se solubilizează greu în apă. Au efect toxic asupra protoplasmei și putere bactericidă superioară fenolului.

Creolina este un amestec de crezoli activați cu săpun de gudron. Este un lichid de culoare brună-închis. Amestecată cu apă în proporție de 5-10% dă o emulsie cu efect bactericid apreciabil, dar cu miros neplăcut.

Amestecul sulfocromic este nelipsit de pe orice masă de laborator, fiind utilizat pentru sterilizarea pipetelor și a lamelor contaminate. Acesta se prepară astfel: se pun 100 g bicromat de potasiu la 400 ml apă distilată, care se încălzește fără a se fierbe, până la completa dizolvare a bicromatului. După răcire se adaugă 1600 ml apă distilată și, treptat, 1000 g acid sulfuric tehnic. Acest amestec se păstrează pe masa de laborator, în pahare conice de 1000 ml sau 2000 ml și în cristalizoare. În momentul în care, prin utilizare, amestecul se oxidează și își schimbă culoarea sa roșie-portocalie în verde, este înlocuit cu altul proaspăt.

Sublimatul (sublimatul corosiv sau biclorura de mercur) este o sare slabă, cristalină, incoloră, solubilă în apă. Are o mare putere bactericidă. În soluții apoase 1% omorâă bacteriile în 1-10 min, în soluție 1/500 omorâă formele sporulate în 45-60

min. Nu alterează țesăturile și mobilierul, dar este toxic pentru om și pentru animale. Trebuie păstrat în sticle de culoare închisă, deoarece lumina zilei îl descompune.

Activitatea sa este mult diminuată de prezența proteinelor și a grăsimilor și, de aceea, nu are o acțiune eficientă asupra sputei și a puroiului.

Poate fi utilizat pentru dezinfecția mâinilor și a obiectelor de piele.

Lizolul este un amestec de crezoli activați cu săpun de potasiu. Se prezintă sub formă de lichid transparent, roșu-brun, care se amestecă ușor cu apa și cu alcoolul. Se întrebuințează în concentrație de 3-5%, pentru dezinfecția obiectelor de bumbac și în soluție de 5-10%, timp de 3-4 h, pentru dezinfecția sputei, a puroiului, a materiilor fecale etc. Este una dintre puținele substanțe dezinfectante cu o acțiune eficientă asupra bacilului Koch. Nu atacă pielea și mucoasele, fiind utilizat și în dezinfecția rănilor.

Varul cloros este o pulbere grunjoasă de culoare albă, cu miros puternic de clor, care se descompune ușor la aer și la lumină. Când pulberea este proaspătă și bine conservată, conține aproximativ 25% clor activ.

Varul cloros poate fi utilizat ca atare, prin adăugarea a 200-400 g var la fiecare kilogram de spută sau de fecale, dar și la obținerea laptelui de var.

Laptele de var (10%) se prepară astfel: peste 1 kg de var cloros se pune treptat o cantitate mică de apă până se obține o pastă, apoi se adaugă restul de apă până la 10 l. Laptele de var se poate folosi cu bune rezultate pentru dezinfecția sputei, a puroiului, a fecalelor, a urinei, precum și pentru grupuri sanitare și cuști de animale infectate.

Cloraminele se prezintă sub formă de pulbere fină, cristalină, de culoare albă sau ușor gălbuie, cu miros de clor și conținând 25% clor activ. Sunt compuși stabili care se folosesc în concentrații mergând de la 0,1 la 5% și chiar mai mult, atunci când se urmărește distrugerea unor spori. Pentru distrugerea bacilului Koch se folosesc soluții de 5-10%.

Cloramina se folosește la dezinfecția halatelor, a unor obiecte de îmbrăcăminte, a mobilierului, a camerelor, a cuștilor de animale, a produselor infectate. Acest dezinfectant poate fi utilizat și sub formă de pulbere, pentru dezinfectarea materiilor fecale, a urinei, a puroiului, a sputei etc., adăugat în aceeași proporție ca și în cazul varului cloros.

Permanganatul de potasiu (KMnO_4) se prezintă sub formă de cristale mari, de culoare violetă-închis. Pentru dezinfectarea mâinilor se folosește o soluție de 1%, pentru mucoasa bucală soluția de 1/5000, iar pentru cea oculară 1/10 000.

Apă oxigenată (H_2O_2) sau peroxidul de hidrogen are o puternică acțiune bactericidă prin eliberarea oxigenului. Se utilizează în concentrație de 3%.

Acizii minerali. Acidul azotic soluție 2%, la temperatura de 40°C distruge germenii sporulați. După dezinfecție, obiectele trebuie spălate bine cu apă și neutralizate cu o soluție de carbonat de sodiu 20%.

Acidul clorhidric se folosește pentru dezinfectarea unor piei de animale moarte de dalac, a grupurilor sanitare etc.

Acidul sulfuric, ca și ceilalți acizi minerali, trebuie folosit cu multă precauție în concentrațiile prescrise, deoarece, odată cu distrugerea microorganismelor, poate provoca și distrugerea obiectelor supuse sterilizării.

Acidul boric are o acțiune dezinfectantă relativ slabă. În concentrație de 5% se folosește pentru dezinfectarea pielii și a mucoaselor.

Bazele tari. *Hidroxidul de sodiu* în concentrație de 2-4% omorâă bacteriile și virusurile.

Varul nestins (oxidul de calciu) se stinge cu apă (600 ml apă la 1 kg var) și se transformă în hidroxid de calciu. Din acesta se obține laptele de var 10% sau 20% în apă.

Pentru dezinfecția excretelor (urină, fecale etc.) se pun 200-300 g var nestins la fiecare kilogram de excrețe.

Săpunurile sunt săruri de sodiu ale unor acizi grași. Ele acționează prin emulsionarea grăsimilor și îndepărtarea mecanică a murdăriei și, implicit, a germeilor.

Detergenții sunt substanțe care, pe lângă acțiunea antibacteriană, au și calitatea de a emulsiona, fiind foarte utilizați la spălarea și curățirea materialelor de laborator, înlocuind în mare măsură săpunul.

Din punct de vedere chimic, detergenții sunt împărțiți în anionici, cationici și amfotici.

Detergenții anionici (Perlan, Dero etc.) dau prin disociere anioni organici toxici. Sunt activi mai ales asupra bacteriilor Gram-pozitive. Sunt cei mai buni agenți de spălare, fiind utilizați la spălarea instrumentelor, a aparatelor, a pardoselilor, a mobilierului, a țeșturilor etc.

Detergenții cationici au o acțiune antiseptică mai puternică decât cei anionici. *Bromocetol* este folosit ca dezinfectant în soluție apoasă 1% și ca antiseptic în soluție 1‰. Deoarece în prezența săpunurilor își pierde activitatea antimicrobiană, este necesar ca înainte de a fi utilizat pentru asepticizarea mâinilor să fie îndepărtat săpunul cu apă și, apoi, cu alcool.

Detergenții amfotici (Tego, Tagonin) sunt utilizați în soluții apoase 1% pentru dezinfecția instrumentelor de laborator, a mobilierului etc. Aceștia au un bun efect de curățire mecanică și o puternică acțiune bactericidă.

CAP. VII. RECOLTAREA PRODUSELOR BIOLOGICE, A APEI ȘI A ALIMENTELOR, PENTRU EXAMENE DE LABORATOR

I. RECOLTAREA ȘI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE

Rezultatele corecte ale unui examen microbiologic depind într-o mare măsură de modul de recoltare a produselor patologice, de condițiile în care acestea sunt transportate și conservate până la efectuarea examenului.

În cursul operațiunilor de *recoltare* a probelor trebuie respectate câteva reguli generale. Astfel:

- materialele (flacoanele, eprubetele, acele, seringile, pensele, spatulele etc.) necesare recoltării trebuie în prealabil sterilizate prin agenți fizici. Substanțele chimice trebuie evitate deoarece urme de substanțe antibacteriene pot împiedica dezvoltarea ulterioară a microorganismelor și falsifica astfel rezultatele;
 - când se urmărește izolarea unui agent microbian este indicat ca, pe cât posibil, recoltarea produselor să se facă înainte de administrarea unui tratament local sau general ca antiseptice, antibiotice sau chimioterapice;
 - recoltarea trebuie executată de medic sau sub directă îndrumare și controlul acestuia, astfel încât pe lângă corectitudinea execuției să se preleveze o cantitate optimă din produsele patologice cele mai caracteristice și cu maximum de semnificație etiologică;
 - prelevarea produsului patologic trebuie să se facă în momentul optim, în funcție de evoluția clinică a bolii astfel încât produsul respectiv să conțină o cantitate maximă din agentul patogen;
 - operațiunea de recoltare se va face, în condiții riguroase de asepsie, pentru a se evita contaminarea produsului cu agenți microbieni fără semnificație clinică;
 - o atenție deosebită trebuie acordată etichetării (identitatea produsului) recipientelor cu produse recoltate și atașării unei fișe complete care trebuie să cuprindă pe lângă datele personale ale bolnavului (nume, prenume, vârstă, ocupație etc.) inclusiv adresă, și următoarele: instituția (care a efectuat recoltarea), data recoltării (ziua și ora), produsul recoltat, diagnosticul clinic, examenul solicitat, tratamentul cu antibiotice, chimioterapie, alte informații (antecedente vaccinale etc.), semnatura medicului.
- Transportul* probelor patologice trebuie de asemenea să aibă în vedere respectarea unor reguli de ordin general dintre care menționăm:
- o ambalare corectă, cu închidere ermetică, astfel încât să evite spargerea sau deschiderea recipientului și contaminarea personalului, în timpul transportului până la laborator;

- luarea unor măsuri de protejare a materialului patogen (refrigerare, lichide conservante, medii speciale de transport etc.) și expedierea rapidă a produsului, eventual prin curier special, niciodată prin poștă;
- când este posibil, pentru rapiditate, examenul de laborator se va începe chiar la locul recoltării prin înșămânțări directe pe medii de îmbogățire, de cultivare etc.;
- pentru obținerea unor rezultate cât mai bune, examenul produselor recolate trebuie să înceapă în cel mai scurt timp de la data recepționării acestora în laborator.

Tehnica de recoltare a unor produse biologice **Recoltarea sângelui pentru examene microbiologice**

În infecțiile generalizate, bacteriile patogene produc o *stare septicemică*, cu evoluție clinică gravă. În astfel de situații examenul microbiologic al sângelui devine indispensabil. Există și unele situații în care pătrunderea germinilor în sânge este pasageră (bacteriemia). Aceasta survine la persoane cu rezistență scăzută la infecții (diabet, ciroză, iradieri etc.) și adesea nu este însoțită de fenomene clinice evidente.

Investigația bacteriologică a sângelui se poate face prin examen microscopic direct, prin hemocultură sau în anumite situații prin inocularea sângelui la animale de laborator.

Examenul microscopic direct al sângelui poate da rezultate pozitive când concentrația în germeni este suficient de mare (peste 10 000 germeni/ml sânge).

Recoltarea se face din pulpa degetului inelar prin înțepare cu un ac steril, după o prealabilă aseptizare. Se îndepărtează prima picătură de sânge cu vată sterilă după care se recoltează picătura următoare. În funcție de scopul urmărit sângele va fi deus pe o lamă sub formă de *picătură groasă* sau va fi etalat sub formă de *frotiu*. Lama, numerotată, pentru identificare, este trimisă la laborator pentru colorare și examinare.

Examenul microscopic al sângelui proaspăt sau al plasmei pe fond întunecat este posibil în prima săptămână de boală în febră recurentă, leptospiroză, septicemie cărbunoasă, oferă informații rapide dar rezultatele pozitive sunt rare.

Hemocultura este metoda cea mai importantă și cea mai utilizată în examenul bacteriologic al sângelui. Aceasta metodă constă din înșămânțarea sângelui pe medii de cultură artificiale, în vederea izolării și identificării agentului cauzal.

Recoltarea sângelui pentru hemocultură se face, de regulă, prin puncție venoasă, dar sângele poate fi obținut și prin puncție arterială sau chiar din măduva osoasă (medulocultură), mai ales când hemocultura din sângele venos rămâne sterilă.

Momentul cel mai potrivit pentru a recolta este cu aproximativ o oră înainte de apariția frisoanelor sau a creșterii temperaturii, deoarece atunci numărul de germeni în sânge este maxim.

În unele boli infecțioase cu bacteriemie obligatorie (febră tifoidă, bruceloză), sângele este mai mare de obținere a unor rezultate pozitive sunt în primele 7-14 zile de la debut.

De asemenea, hemocultura trebuie făcută înainte de a se începe tratamentul cu antibiotice sau, dacă acest lucru nu a fost posibil, recoltarea sângelui se va face înainte

de administrarea unei noi doze de antibiotice. La nevoie se va neutraliza acțiunea inhibitoare a medicamentelor administrate prin introducerea unor substanțe în medii de cultură: acid paraminobenzoic 1/100 000 împotriva sulfamidelor, penicilină 5-6 mg pentru a neutraliza 100 mg Streptomycină și sulfat de magneziu 100 mg pentru 1 ml de sânge.

Adăugarea de polianetol sulfonat de sodiu în concentrație de 0,025% are un efect anticoagulant, antifagocitar și inhibitor al unor antibiotice.

Inactivarea acțiunii bactericide naturale a sângelui și chiar a medicamentelor antimicrobiene se realizează în general, în mod satisfăcător, prin simpla diluție a sângelui în mediul de cultură, într-o proporție minimă de 10%.

Recoltarea sângelui, aproximativ 10-20 ml, se face în mod curent din vena plicii cotului, după o prealabilă antiseptizare a regiunii cu alcool sau cu tinctură de iod. În acest scop se folosește fie o seringă preferabil de tip Luer de 10-20 ml, fie un set de transfer adaptat la un balon cu mediu de cultură (Fig. 13).

În acest din urmă caz se realizează hemocultura în circuit închis cu înșămânțarea directă și imediată, care evită contaminarea produsului cu germeni nepatogeni din aer sau de pe tegumente.

Toate materialele utilizate pentru hemocultură trebuie să fie perfect sterile, iar tehnica de recoltare și înșămânțare a sângelui trebuie executată cu o deosebită grijă, pentru a se evita suprainfecția.

Inocularea sângelui la animale de laborator este necesară în cazuri speciale. Sângele trebuie inoculat la animale, în oul embrionat sau pe culturi de celule, imediat după recoltare sau, dacă acest lucru nu este posibil, trebuie făcut necoagulabil prin defibrinare cu perle de sticlă sau prin folosirea unor substanțe anticoagulante.

Recoltarea scrupurilor purulente

Puroiul este un exsudat bogat în leucocite, în mare parte alerant, cu o cantitate mai mare sau mai mică de fibrină și germeni.

Aspectul puroiului diferă în funcție de natura microbului care a provocat fenomenul și care imprimă diferite caracteristici externe, ce vor constitui informații prețioase pentru diagnostic.

De cele mai multe ori puroiul este rezultatul unei prezențe microbiene - *supurație septică*. Sunt totuși situații în care puroiul este consecința unei iritații provocate de diferite substanțe chimice iritante prin constituția lor - *supurație aseptică*.

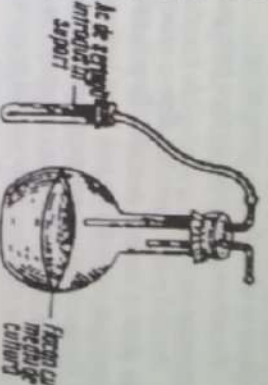


Fig. 13. Set de transfer pentru hemocultură.

Pentru a putea determina natura etiologică a procesului supurativ sunt necesare izolarea și identificarea germenilor.

Recoltarea puroiului se face prin puncție, aspirație sau prelevare cu ansa ori cu tamponane sterile.

Puroiul poate fi recolat dintr-o *colecție închisă*: pustulă, furuncul, abces, flegmon sau dintr-o leziune deschisă. În primul caz, recoltarea se va face după o riguroasă aseptizare a locului cu iod. Dacă leziunea este foarte superficială (cazul pustulei sau al furunculului) se puncționează și se recoltează cu o pipetă Pasteur. Când este mai profundă (cazul abcesului) recoltarea se va face cu o seringă prevăzută cu un ac lung și gros, iar când este inabordabilă pe această cale, recoltarea are loc în urma unei incizii făcute într-un serviciu de chirurgie.

Atunci când este vorba de o *plăgă deschisă*, recoltarea se face cu pipeta Pasteur, cu ansa sau cu tamponul.

Este bine ca recoltarea să fie practică înainte de instituirea tratamentului.

Caracterile macroscopice ale puroiului recolat permit orientarea către un anumit germen deoarece:

- stafilococul produce un puroi cremos, vâscos;
- streptococul, un puroi serofibrinos, clar, mai puțin vâscos;
- meningococul, un puroi vâscos, cu reflexe verzui;
- piocianicul, un puroi de culoare albastră;
- bacilul Koch, un puroi fluent și puțin fibrinos;
- germeni anaerobi produc un puroi seros, tulbure, degajând miros putrid.

Recoltarea secrețiilor uretrale și vaginale

Uretra persoanelor sănătoase, exceptând porțiunea anterioară unde se pot găsi specii bacteriene saprofite, nu conține floră microbiană. Apariția unei secreții uretrale trebuie considerată proces patologic infecțios.

Recoltarea secreției uretrale la *bărbați* se face dimineața, înainte de micțiune, din meatul urinar, cu o ansă sterilizată prin flambare sau cu un tampon de vată steril. În infecțiile cronice, când secreția este absentă se recurge la masaj de prostată.

La *femei*, de regulă, odată cu recoltarea secreției uretrale se recoltează și secreții vulvo-vaginale.

În mod normal, *secreția vaginală* este un transudat al mucoasei vaginale care conține celule epiteliale de descuamare și uniți germeni saprofiti variabili în funcție de vârstă și starea fiziologică a femeii. De la pubertate și până la menopauză cavitatea vaginală a femeii sănătoase este populată cu bacili lactice care prin scindarea glicogenului cu formare de acid lactic, creează un pH local scăzut care împiedică dezvoltarea bacteriilor patogene.

De la femeie, recoltarea secrețiilor muco-purulente se face preferabil după 10 zile de la debutul ciclului menstrual, din orificiul colului uterin, orificiul glandelor Bartholin și uretră, cu ajutorul unei anse sterilizate prin flambare și răcită, sau cu tamponane

subțiri de vată sterile. Pentru o recoltare corectă din colul uterin trebuie utilizate valvele. Adeseori sunt necesare recoltări concomitente din rect.

La fete, recoltarea secrețiilor vulvo-vaginale se face cu ansa.

În caz de suspiciune de diferite, se recoltează obligatoriu și exsudat nazo-faringian.

Recoltarea exsudatului nazo-faringian și amigdalian

Cavitățile nazală și bucofaringiană sunt populate în mod normal de numeroase specii bacteriene saprofite. În cazuri patologice însă aici se cantonează și se dezvoltă unele bacterii sau virusuri care pot produce imbolnăviri grave: bacilul difteric, meningococul, stafilococul, streptococul hemolitic etc. cu prezența unor exsudate specifice (angina difterică de exemplu).

Recoltarea exsudatelor se face cu ajutorul unor tamponane de vată nehidrofilă sterilizate și protejate prin menținerea lor în eprubete de sticlă sterile.

Recoltarea se face dimineața, pe nemâncate sau la cel puțin 3-4 ore după masă. De regulă se utilizează cel puțin două tamponane: unul pentru exsudatul amigdal-faringian și altul pentru exsudatul nazal.

Bolnavul este așezat pe un scaun cu fața spre o sursă de lumină. Se folosește un apăsător de limbă steril (la nevoie sterilizat prin flambare) care, după utilizare este introdus într-o soluție de sublimat 1% sau hipermanganat de potasiu 2%. După evidențierea peretelui posterior al faringelui, a amigdalelor și pilierilor, se șterg cu un tampon secrețiile, falsele membrane și punctele albe de pe amigdale.

Se recomandă ca persoana care execută recoltarea să nu stea direct în fața bolnavului, ci lateral pentru a evita să fie contaminat cu picăturile declanșate de tuse sau strănut.

Recoltarea exsudatului nazal se va face cu ajutorul unui tampon de vată sterilă cu iuța subțire, cu aceleași precauțiuni menționate mai sus.

În unele situații, când se presupune o infecție virală, prelevarea secreției nazo-faringiene se face sub formă de spăltură nazo-faringiană. Aceasta se execută cu ajutorul unei seringi de 10 ml la care se adaptează un tub de cauciuc, ambele sterile, prin care se introduce în una din fosele nazale ale bolnavului cca 10 ml soluție salină fiziologică (CINa 8,5‰). Ulterior aceasta este recoltată din gură într-o placă Petri sterilă și transvazată într-un tub steril în care se adaugă câte 1 ml din soluția de Penicilină (2000 UI/ml) și Streptomycină (200 μg/ml) pentru protejarea virusurilor.

Recoltarea sputei

În cazul unor afecțiuni ale aparatului respirator, elementele patologice care apar sunt eliminate prin spută.

Sputa este recoltată de preferință pentru a se obține secrețiile acumulate în cursul nopții. După o gurgură cu ser fiziologic steril, bolnavul este invitat să tusească și să expectoreze într-o placă Petri sau alt recipient curat, preferabil sterilizat prin căldură.

În cazuri speciale, secreția bronșică se va recolta prin aspirare în cursul bronhoscopiei iar la copii mici, care nu expectorează, sputa se va recolta prin spăltură gastrică.

Sputa recoltată trebuie introdusă în lucru într-un interval de timp cât mai scurt, de maximum 2 ore. În caz contrar va fi păstrată la frigider ($+4^{\circ}\text{C}$).

În tuberculoza pulmonară, se examinează sputa recoltată în decurs de 24 ore.

Recoltarea lichidului cefalorahidian

În general, lichidul cefalorahidian se obține prin puncție rahidiană. Aceasta se execută, cu luarea unor măsuri de asepsie riguroasă, similare celor menționate la recoltarea sângelui prin hemoculturi. Bolnavul este culcat lateral, cu coloana vertebrală flectată pentru a se crea spațiul necesar introducerii acului. Se aseptizează cu alcool și tinctură de iod, regiunea dorso-lombară la nivelul vertebrelor L4-L5 și se introduce un ac steril de 8 cm, cu mandrenul adaptat, până în spațiul subarahnoidian. Se scoate mandrenul, se colectează 5-8 ml lichid într-o eprubetă sterilă după care se închide steril eprubeta și se trimite la laborator. După recoltare bolnavul va sta în continuare culcat, fără pernă, cel puțin 1-2 ore.

Recoltarea urinei

Recoltarea urinei se face înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapice. La bătați, se recomandă ca bolnavul să-și facă toaleta glandului cu apă caldă și săpun. Primele jeturi de urină, fiind contaminate cu floră microbiană saprofită, sunt îndepărtate; în continuare, se recoltează 20-30 ml urină în recipiente cu dop sterile (flacone cu gât larg, borcane etc.).

La bolnavii cu retenție urinară, recoltarea se poate face prin sondaj vezical sau prin puncție suprapubică.

Explorarea fiecărui rimichi în parte este posibilă prin recoltarea separată a urinei din fiecare ureter în cursul cistoscopiei.

La copii mici recoltarea se poate face în pungi speciale de plastic.

La femei urina se recoltează din mijlocul jetului, după o prealabilă toaletă locală urmată de tamponarea meatusului urinar cu ser fiziologic steril. Recoltarea se face într-un flacon de sticlă cu gâtul larg, steril.

Recoltarea sterilă cu sonda se face numai în spitale și numai în cazuri excepționale. Pentru cercetarea baciului Koch se recoltează aproximativ 1 l urină, în flacone sterile, amestec din urina eliminată în 24 ore. În acest interval probele recolate se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$.

Când examenul se face în scopul depistării unei infecții gonococice sau cu trichomonas, atunci se recoltează și se prelucerează separat primul jet de urină.

Urina recoltată este transportată imediat la laborator pentru examinare. Urina lăsată la temperatura laboratorului mai mult de 2 ore de la recoltare nu mai poate fi utilizată pentru examene bacteriologice corecte.

În anumite cazuri, bolnavul trebuie pregătit în mod special înainte de recoltare.

Pentru cultivarea leptospirelor, este necesară alcalinizarea urinei prin administrare de bicarbonat de sodiu. Astfel, se schimbă pH-ul obișnuit al urinei care omorâă rapid leptospirele.

Recoltarea materiilor fecale pentru coproculturi

Flora microbiană prezentă în materiile fecale este foarte complexă. Ea variază mult în funcție de vârstă și alimentație. Specii bacteriene patogene pentru aparatul digestiv sunt, de asemenea, numeroase. În plus, chiar și unii germeni care populează intestinul omului sănătos, cum sunt *B. proteus*, *B. piocianic*, *Stafilococ* și alții pot produce afecțiuni grave în anumite situații, în care se modifică echilibrul biologic al florei bacteriene normale.

Izolarea și identificarea unui agent etiologic existent în materiile fecale sunt posibile prin efectuarea unor coproculturi sistematice. Acestea trebuie repetate după vindecarea clinică a bolnavului, pentru a depista la timp un eventual purtător de germeni. Materiile fecale sunt recolate în recipiente speciale numite coprocultoare (Fig. 14).

Coproculturile sunt obligatorii în diagnosticul: holerei, salmonelozelor, dizenteriei bacilare, enterocolicilor provocate de bacilul coli, tuberculozei intestinale etc.

Pentru examenul bacteriologic, la bolnavii în perioada de stare, din scaunul emis spontan, defecat în vase sterile, se recoltează în recipiente de plastic sterile tip, cu ajutorul unei lingurițe fixată de obicei la capac. Se aleg porțiunile din scaun cu mucus și eventual urme de sânge; când acestea lipsesc se recoltează boluri de fecale din 2-3 locuri diferite. Când se solicită un examen microbiologic și parazitologic complet, cantitatea de fecale trebuie să fie de minimum 5 gr. Dacă scaunul este lichid, recoltorul tip va fi umplut pe jumătate.

La foștii bolnavi, purtători, neospitalizați, scaunul este provocat prin purgativ salin (amestec de sulfat de Na și Mg câte 15 gr. pentru adult, dizolvate în 250 ml apă). Pentru controlul baciului tife și a infecției cu *E. histolytica* prelevarea se face timp de 3 zile consecutiv, după o administrare unică de purgativ. Defecarea se face în vase sterile din care se recoltează în recipiente sterile tip.

Tehnici speciale de recoltare:

Pentru dizenteria bacilară, prelevarea se face cu ajutorul sondei Nelaton nr. 16-18, în toate cazurile de dizenterie acută, sau cronică, pentru depistarea purtătorilor etc. Sonda, sterilizată prin fierbere, se umezește cu soluție fiziologică sterilă, înainte de introducerea în rect. La adult se introduce 15-20 cm, la copii 10-12 cm, în coloniul sigmoid. Produsul recoltat se suspendă în 2 ml. soluție NaCl 8,5% sterilă sau lichid conservant care se găsește într-un tub cu închidere ermetică.

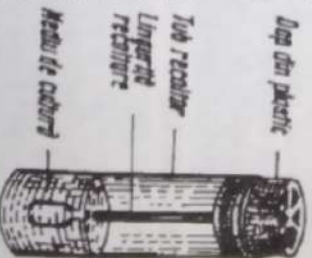


Fig. 14. Coprocultor.

3. COLORANȚI ȘI COLORAȚII

Coloranții folosiți în mod curent în bacteriologie sunt substanțe organice, de obicei colorate, ușor solubile, de cele mai multe ori sintetice, având proprietatea de a colora diferite substraturi chimice.

Colorația se realizează prin combinație chimică, absorbție sau dizolvare în structura pe care o pune în evidență.

Colorațiile pot fi făcute fie pe germeni vii, fie pe germeni omorâți.

Colorarea microorganismelor vii se face cu coloranți netoxici pe preparate proaspete.

Colorarea germenilor omorâți este cea mai utilizată în microbiologie.

Pentru a fi colorate, bacteriile sunt, în prealabil, supuse unor operații pregătitoare.

Operații pregătitoare în vederea colorării

Prepararea frotiului. Frotiul se prepară prin etalarea produsului de examinat pe o lamă curată și perfect degresată, astfel încât germeni să formeze un strat subțire, uniform. Etalarea culturii sau a produsului se realizează cu ajutorul unei anse de platină sau al unei pipete Pasteur. Se ia o picătură din cultura lichidă și se întinde circular pe lamă. Când cultura este pe mediu solid, se raclează cu ansa sterilizată și răcită o porțiune din cultură și se depune pe o lamă de sticlă, pe care, în prealabil, s-a pus o picătură de soluție salină fiziologică, după care se omogenizează și se răspândește uniform pe o suprafață circulară.

Frotiul astfel confecționat este lăsat să se usuce la temperatura camerei.

Fixarea frotiului. După uscare, frotiul este supus operației de fixare prin căldură sau prin lichide fixatoare, cum sunt: alcoolul metilic, alcoolul etilic, alcoolul-eter etc. Pentru fixare prin căldură se trece lama de 2-3 ori cu fața opusă frotiului, prin flacăra unui bec de gaz. Încălzirea se face la 60-70°C (lama este suportată pe dosul mâinii). Prin fixare bacteriile sunt omorâte, evitându-se astfel pericolul infectării. În plus, se mărește aderența preparatului de lamă, iar afinitatea sa pentru colorant crește. O fixare corectă nu trebuie să producă modificări ale formei și ale structurii microorganismului supus acestei operații.

Mordantarea este tratarea frotiului cu anumite substanțe chimice, numite *mordanți* (de exemplu, soluția Lugol), în scopul de a intensifica activitatea coloranților. Mordanții, prin afinitatea puternică pe care o au atât față de colorant, cât și față de substratul supus colorării, facilitează și întăresc legătura dintre aceștia, contribuind astfel la obținerea unei colorații mai intense și de o calitate mai bună. Pentru coloranții bazici se folosesc mordanți acizi (acid tanic, acid picric etc.) iar pentru coloranții acizi se folosesc mordanți bazici (sulfat de fier, alauin etc.).

Prepararea unor coloranți folosiți în bacteriologie

Coloranții sunt preparați și păstrați în laborator sub formă de soluții alcoolice saturate, cunoscute și sub numele de "*soluții-mamă*". Aceste soluții se prepară prin mojararea unei cantități de 10-15 gr colorant cu 100 ml alcool de 96°, pentru soluția

saturată de violet de gențiană sunt suficiente numai 6-8 gr colorant. După preparare, soluțiile saturate sunt ținute 2-7 zile la termostat la 37°C și agitate de mai multe ori pe zi. După filtrare prin hârtie de filtru, soluțiile se păstrează la loc întunecos în flacoane de sticlă de culoare închisă cu dop rodar. În aceste condiții, coloranții pot fi păstrați timp îndelungat.

Pentru colorarea germenilor se folosesc *soluții apoase* de colorant. Acestea se prepară dintr-o soluție alcoolică saturată, care este diluată în proporție de 1/10 în apă fenolată 2%.

Soluțiile apoase pot fi preparate și direct din substanța colorantă astfel: 1 gr de colorant (cristale) este mojarat și dizolvat în 10 ml alcool. Se adaugă apoi 2 ml fenol și o parte din apa distilată. După ce se amestecă bine, se trec într-un flacon de sticlă în care se adaugă și restul de apă distilată până la 100 ml. Soluția astfel preparată se menține 24 h la termostat, la 37°C, apoi se filtrează prin hârtie de filtru și se transvazează într-o sticlă picătoare, fiind bună de folosit. Soluțiile apoase de colorant nu pot fi păstrate un timp prea îndelungat, deoarece se degradează.

În colorațiile obișnuite se mai folosesc și alte soluții, ca: *soluția Lugol* (1 gr iod, 2 gr iodură de potasiu și 300 ml apă distilată) și *soluția de alcool-acetonă* (3 părți alcool de 96° și o parte acetonă).

Colorațiile pot fi simple, diferențiale și speciale.

Colorațiile simple

Colorația cu albastru de metilen. Frotiul uscat și fixat apoi la flacăra este acoperit cu soluție de albastru de metil timp de 1-2 minute. Se spală după aceea frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Prin această metodă, toate elementele din câmpul microscopic apar colorate în albastru. Este o colorație rapidă, care pune în evidență forma, gruparea și, eventual, raporturile germenilor cu leucocitele sau cu alte elemente prezente în frotiu.

Colorația cu fucsina fenicată Ziehl diluată 1/10 se efectuează în același mod ca și cea cu albastru de metilen. Elementele din frotiu apar colorate în roșu.

Colorațiile diferențiale

Colorația Gram. Este o colorație foarte mult utilizată în bacteriologie, deoarece imparte bacteriile în două mari categorii: bacterii Gram-pozitive și bacterii Gram-negative.

Tehnica colorației este următoarea:

- frotiul uscat este fixat prin căldură;
- se acoperă lama cu soluție apoasă de violet de gențiană și se lasă timp de 1-2 min.;
- se îndepărtează colorantul și se acoperă lama cu soluție Lugol pentru 2 min.;
- se îndepărtează mordantul (soluția Lugol) și se tratează frotiul cu alcool-acetonă timp de câteva secunde;

- se spală rapid lama cu apă de robinet și se acoperă cu fucsina diluată 1/10 în apă, timp de 30 s până la 1 min.;

- se îndepărtează fucsina și se spală frotiul cu apă de robinet; după uscare se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Bacteriile Gram-pozitive rezistă la decolorare, rămânând colorate în violet, dar cele Gram-negative sunt decolorate de alcool-acetonă și recolorate în roșu.

Colorația Ziehl-Nielsen. Această colorație se utilizează pentru punerea în evidență a *bacilului tuberculozei* și a *bacilului leprei*.

Tehnica folosește pentru colorație:

- frotiul uscat se fixează la flacără;

- se acoperă lama cu fucsina fenicată Ziehl și timp de 10 min. se încălzește intens, cu ajutorul unei lămpi de alcool sau cu flacăra unui bec Bunsen până la emisia de vapori, fără a se ajunge la fierbere; fucsina evaporată prin încălzire se înlocuiește imediat;

- se îndepărtează colorantul, se spală frotiul cu apă de robinet și se decolorează cu acid azotic diluat 1/3 sau cu acid sulfuric diluat 1/4;

- se îndepărtează acidul și se spală lama cu apă de robinet, după care se decolorează frotiul cu alcool de 96°;

- se îndepărtează alcoolul și se spală frotiul din nou, cu apă de robinet, după care se recolorează cu o soluție apoasă de albastru de metilen 1% timp de 1 min.;

- se spală frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

Bacilul tuberculozei și al leprei, care rezistă la decolorare cu acid și alcool, sunt colorați în roșu, în timp ce toate celelalte elemente de pe frotiu sunt colorate în albastru.

Colorații speciale

Metode de punere în evidență a capsulei bacteriene

Metoda Burri. Pe o lamă perfect curată se pun o picătură din suspensia de bacterii capsulate și o picătură de tuș de China. După ce se omogenizează, se face un frotiu prin etalarea amestecului cu o altă lamă.

Se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Pe fondul negru al preparatului, bacteriile împreună cu capsulele lor apar incolore.

Colorația Loeffler cu albastru de metilen se efectuează cu o soluție învechită de albastru de metilen Loeffler. Prin această colorație corpul bacterian se colorează în albastru, iar capsula, în roz.

Colorația pentru cili bacterieni. Cili nu pot fi văzuți la microscopul optic pe preparatele native sau pe frotiurile cu colorații obișnuite. Pentru a fi puși în evidență, se folosesc metode speciale de colorație.

Metoda Zeilnow. Colorația după această metodă se desfășoară astfel:

- se prepară o suspensie diluată de germeni în apă distilată, astfel încât să se obțină pe frotiu celule izolate; din aceasta se iau 2-3 picături cu o pipetă Pasteur și se depun pe o lamă degresată și flambată;

- se lasă frotiul să se usuce, după care se fixează cu formol diluat 1/10, timp de 10 min.;

- se pune lamela în apă distilată timp de 3 min., după care se introduce într-o soluție de tain și de tartar dublu de sibi și potasiu, încălzită la 60-70°C, timp de 10 min.;

- se scoate lamela cu o pensă și se clătește bine în apă distilată;

- se acoperă frotiul cu o soluție de sulfat de argint și amoniac care se prepară în momentul folosirii și se încălzește ușor la flacără, timp de 30-60 s;

- se spală frotiul cu apă distilată, se usucă și se montează în ulei de cedru, prin aplicarea lamei cu frotiul în jos pe o lamă foarte curată, după care poate fi examinată la microscop.

Metode de colorare a sporilor

Metoda Gray modificată. Se fac frotiuri care se lasă să se usuce și se fixează prin căldură.

Se acoperă lama cu o soluție apoasă de verde malahit 5% și se încălzește de trei ori până apar vapori. După fiecare încălzire se îndepărtează colorantul și se înlocuiește cu altul proaspăt.

Se spală apoi frotiul cu apă și se acoperă cu o soluție de fucsina diluată 1/10, timp de 1-2 min.

Se îndepărtează colorantul, se spală lama cu apă, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Sporii apar colorați în verde-albastru, iar corpul bacterian apare colorat în violaceu.

Impregnarea argentică (metoda Fontana-Tribondeau). Această colorație se folosește, în special, pentru punerea în evidență a *treponemelor* și a *leptospirozelor*.

Tehnica este următoarea:

- frotiul uscat nu se fixează la flacără;

- pentru fixare și deshemoglobinizare se acoperă frotiul cu soluție Rügge, care trebuie schimbată de trei ori în decurs de 1 min.;

- se spală lama cu apă distilată și se acoperă apoi 3 min cu o soluție de acid tanic 5%, care se încălzește până la emisie de vapori;

- se spală cu apă distilată și se colorează frotiul cu o soluție amoniacală de nitrat de argint, timp de 10 min, încălzită până la emisie de vapori;

- se spală cu apă distilată, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

Treponemele și leptospirele apar colorate în negru-brun, iar restul frotiului, în galben.

Colorația May-Grünwald-Giemsa se folosește în microbiologie pentru colorarea preparatelor de sânge, în care se cercetează prezența unor microorganisme, ca: spirochete, hematozoarul palustru, toxoplasma etc.

Frotiul obținut prin etalarea pe lamă în strat subțire a unei picături proaspete de sânge este fixat prin acoperirea cu soluție May-Grünwald, timp de 4 min sau cu alcool

metlic pur, timp de 10 min. După fixare, peste soluția May-Grünwald se adaugă o cantitate egală de apă distilată neutră și se lasă 1 min.

Se îndepărtează soluția May-Grünwald și se acoperă lama cu soluție Giemsa diluată (3 picături soluție Giemsa la 2 ml apă distilată neutră). După 20 min se îndepărtează colorantul, se spală lama cu apă distilată, se lasă să se usuce și se examinează la microscop. Pe aceste preparate spirochelele sunt colorate în violet, hematozoarul se colorează în albastru-violet etc.

Cap.IX. PATOGENITATEA MICROORGANISMELOR ȘI PROCESUL INFECTIOS

Microorganismele care prezintă un interes medical nu reprezintă decât un număr foarte mic din vasta și extrem de diversă lume microbiană care ne înconjoară. De la naștere, omul intră în contact cu microbii stabilind cu aceștia relații ce pot îmbrăca diverse aspecte: saprofitism, comensalism, patogenitate.

În cazul *saprofitismului*, microorganismul saprofit și omul sunt complet independenți unul față de celălalt. Unele bacterii saprofite pot exista pasager pe suprafața pielii și a mucoaselor dar prezența lor este total inofensivă.

Relația de *comensalism* presupune că germenii comensali nu pot trăi decât în contact sau în imediata apropiere a celulelor umane sau animale. Aceștia se dezvoltă pe scama produselor de metabolism celular fără însă a produce manifestări patologice gazdei. În această categorie intră bacteriile care se găsesc în mod normal și se multiplică și se dezvoltă pe piele sau mucoasele orală, nazofaringiană, intestinală sau vaginală constituind flora comensală normală locală. În unele situații, fie microorganismul comensal sau gazda, fie ambele pot avea un beneficiu din această asociație și atunci este vorba de *simbioză*. Se cunoaște faptul că unele bacterii ale tubului digestiv sintetizează vitamina K sau unele vitamine din grupul B indispensabile omului, dar pe care acesta nu le poate produce. De asemenea, prezența florei intestinale normale, și implicit a unor antigene microbiene după naștere, solicită sistemul imunitar și formarea de imunoglobuline. Simbioza se mai poate manifesta și prin efectul antagonist, de barieră, pe care îl are flora normală față de unele bacterii sau ciuperci microscopice patogene.

Patogenitatea este capacitatea unui microorganism de a provoca gazdei parazitare un proces infecțios. Această capacitate este strâns legată pe de o parte, de mijloacele de agresiune pe care parazitul le posedă și pe de altă, de capacitatea de apărare antiinfecțioasă a organismului atacat. Când rezistența acestuia scade, chiar și unele bacterii considerate saprofite pot deveni agresive, patogene.

Bolile infecțioase sunt de fapt rezultatul unui conflict între agentul patogen și gazda sau terenul receptiv în care germeul tinde să invadeze țesuturile în timp ce organismul reacționează pentru a elimina sau distruge agentul respectiv.

Puterea patogenă a unei bacterii ține pe de o parte de capacitatea de invazie și multiplicare (virulența) în interiorul organismului și pe de altă parte de producerea unor substanțe toxice (toxigeneză) pentru acesta.

Virulența este capacitatea unui microorganism patogen de a pătrunde în organism și de a se multiplica în țesuturile și umorile acestuia.

Invazia microorganismului se face în general în trei etape: adeziunea și colonizarea urmată de invazia pielii sau mucoaselor, pătrunderea și atingerea spațiilor subcutanate și submucoase și atingerea viscerelor prin diseminare hematogenă. Această invazie

CAP. X. MIJLOACE DE APĂRARE ALE ORGANISMULUI ÎMPOTRIVA AGRESIUNII MICROBIENE

Mecanismele de apărare antimicrobiană ale organismului sunt numeroase, complexe și adesea interdependente. Acestea determină uneori intervenția concomitentă atât a elementelor nespecifice celulare și umorale, care intervin în orice situație, cât și a elementelor specifice capabile să recunoască antigenele agentului patogen în cauză.

Prin urmare este necesar să studiem atât *rezistența naturală* sau *imunitatea naturală*, care există la primul contact cu microbul patogen, cât și *existența dobândită* sau *imunitatea specifică dobândită*, care se formează ulterior.

1. REZISTENȚA NATURALĂ (IMUNITATEA NATURALĂ)

Rezistența naturală reprezintă capacitatea înăscută a unui individ de a se opune agresiunii unui asemenea patogen. Această rezistență comportă un număr important de 4 mecanisme specifice complexe care se declanșează și se adaptează situației provocate de agentul agresor. Mecanismele declanșate se opun aderenței, pătrunderii, supraviețuirii și multiplicării microorganismului și intervin printr-o linie de apărare de suprafață și printr-o barieră de protecție de profunzime.

Linia de apărare de suprafață este constituită din barierele cutaneo-mucoase care acționează prin agenți fizici, chimici și biologici.

Bariera fizică este constituită pe de o parte din pielea intactă cu numeroasele ei straturi de celule epidermice ce se cheatămizează și se descuamează superficial în permanență, facilitând astfel și îndepărtarea germeniilor și, pe de altă parte, din mucoasele care, fiind formate dintr-un singur strat de celule, sunt mai expuse agresiunii. Toți mucoasa respiratorie acoperită de cili vibrații și mucus antrenează și elimină în exterior corpusculii microbieni. De asemenea, peristaltismul intestinal și fluxul urinar antrenează în permanență către exterior eventuali agenți patogeni.

Bariera chimică este constituită din producerea locală a unor metaboliți cu grad de aciditate locală ridicată (suc gastric, secreție vaginală, urină), lizozimul din secrețiile nazale, lacrimale, intestinale, salivare, care atacă peretele bacteriilor Gram-negative, secreția pancreatică care produce inactivări enzimactice etc.

Bariera biologică este constituită din flora microbiană comensală la nivelul pielii și mucoaselor care prin acțiunea sa antagonică față de agenții patogeni are rol în menținerea echilibrului biologic local.

Bariera de protecție de profunzime este constituită dintr-o *reație inflamatorie*, succesiune de reacții fiziopatologice care se declanșează la trecerea de bariera cutaneo-mucosă și pătrunderea unui agent agresor în țesutul conjunctiv.

Toxinele și produșii de metabolism ai microorganismelor antrenează o serie de substanțe chimice (histamină etc.) care produc o acțiune celulară ce se exprimă prin inflamație.

Substanțele chimice produc o serie de fenomene vasculare cum sunt: dilatarea arteriolelor și capilarelor, cu o creștere a permeabilității și exudarea unor factori plasmatici (complement, fibrinogen etc.) stază sanguină cu creșterea adeziunii celulare de endotelul vascular urmată de marginalizarea leucocitelor și diapedeza lor în direcția focarului de infecție. Clinic apare o roșeață locală.

Reacția inflamatorie provoacă o migrare a fagocitelor (polinucleare, monocite).

Fenomenul de fagocitoză se declanșează în mai multe etape:

- *adeziunea* agentului patogen de membranele fagocitelor. Există o proteină care recunoaște în mod special zaharurile și care se leagă de diferitele zaharuri de la suprafața bacteriei (manoză - galactoză);

- *inglobarea* microbului prin invaginare a membranei fagocitului, proces favorizat de prezența unor anticorpi pe suprafața germeniului;

- *formarea unei vacuole de fagocitoză*. La suprafața acestei vacuole se acumulează granulații lizozomiale care conduc la formarea vacuolei de digestie. Concomitent se produc concentrări de enzime hidrolitice și reacții oxidative care dau naștere la apă oxigenată și alte forme de oxigen activat. Se produce o fixare de halogeni pe membrana bacteriană și o scădere bruscă a pH-ului cu efect letal pentru bacterie dar cu efect favorabil asupra enzimelor lizozomiale ale fagocitului. În acest proces intervin de asemenea și alți factori (interferon gama, etc.) produși de macrofagele activate.

Bacteriile care nu au fost distruse în procesul inflamator local ajung în ganglioni pe cale limfatică apoi pătrund în circulația sanguină în diverse organe dar pe tot acest parcurs ele se confruntă în permanență cu sistemul fagocitar mononuclear care posedă o înaltă capacitate macrofagică. Cu ajutorul acestor celule, microbii sunt omorâți și eliminați din sistemul circulator.

Fagocitoza poate fi compromisă de factori care țin de agentul patogen sau de gazdă. Din prima categorie face parte multiplicarea extracelulară, posibilă la bacteriile protejate de capsulă sau bacterii care produc leucocidină, o substanță toxică pentru fagocit. De asemenea, unele bacterii (*Bacilul Koch*, *Salmonella*, *Brucella* etc.) pot rezista fagocitozei și se multiplică intracelular.

În ce privește factorii care compromit fagocitoza din cauza gazdei, aceștia țin de carente de vitamine (A, C), concentrare de săruri minerale (Zn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++}), factori toxici (alcool), afecțiuni diverse (diabet), tratament cu glicocorticoizi care împiedică reacția inflamatorie etc.

2. IMUNITATEA SPECIFICĂ DOBÂNDITĂ

Imunologia este o ramură a biologiei care se ocupă atât cu studiul diverselor tipuri de imunitate și a mecanismelor de răspuns imun cât și cu aspectele genetice, chimice, patologice și de aplicare practică privind procesele specifice de interacțiune dintre antigene și organism în ansamblu sau dintre antigene și anumite elemente ale sale (celule limfoide, macrofage, anticorpi etc.).

Imunitatea este starea de sensibilitate specifică a organismului față de anumite substanțe care posedă proprietăți antigenice. Această stare de sensibilitate se caracterizează prin dezvoltarea unui răspuns imun la contactul cu imunogenul.

Imunitatea poate îmbrăca diferite forme: imunitate naturală, toleranță imună, imunitate dobândită natural sau artificial, imunitate de protecție, hipersensibilitate etc.

Deoarece reacțiile imunitare nu sunt declanșate decât de prezența unor substanțe străine de organism, este necesar să definim noțiunile de self și nonself.

Prin *self* (structuri proprii) înțelegem totalitatea macromoleculelor solubile sau structurale din celule, organe sau țesuturi care alcătuiesc un organism și care sunt considerate în raport cu sistemul imun al aceluiași individ, care recunoaște aceste macromolecule ca proprii și nu reacționează împotriva lor.

Termenul de *non-self* (structuri străine) este opus noțiunii de self și reprezintă un material (macromolecule, celule, țesuturi) străin, în raport cu sistemul imunologic al organismului considerat. Calitatea de non-self este prima condiție pe care trebuie s-o îndeplinească o substanță antigenică.

După mecanismele de răspuns imun și după tipul factorului imunologic, se disting două grupuri mari de procese imunologice: imunitatea mediată prin anticorpi (*imunitate umorală*) și imunitatea mediată celular (*imunitate celulară*).

Răspunsul imun celular, la care participă elemente aparținând sistemului limfoid, protejează organismul față de agresiunea virusurilor, bacteriilor intracelulare, fungilor, parazitilor, țesuturilor străine și celulelor canceroase, iar sistemul umoral (componente chimice specifice din sânge și umori) protejează față de infecții virale și bacteriene extracelulare.

În ansamblu, răspunsul imunitar, celular sau umoral, este determinat de două tipuri de limfocite: T și B.

Limfocitele T mediază răspunsul celular. Ele poartă receptori pentru antigen, capabili să recunoască substanțele străine apărute în organism, care ulterior sunt captate și distruse.

Limfocitele B mediază răspunsul umoral. Ele posedă receptori pentru antigen cu ajutorul cărora recunosc substanțele străine. Ca urmare, se diferențiază în *celule plasmantice* (plasmocite) provocând o serie de răspunsuri imune bazate pe producerea de anticorpi ce conduc în final la neutralizarea și eliminarea antigenelor străine.

În afara limfocitelor T și B, sistemul imunitar mai posedă și alte tipuri de celule, *accesorii*, cu rolul de captare a substanțelor străine, prelucrarea și prezentarea lor limfocitelor (*monocite, macrofage*), eliminarea particulelor străine atacate de sistemul imun (*polimorfonucleare*) și medierea unor schimburi fiziologice care însoțesc reacțiile imunitare (*bazofile, mastocite*).

2.1. ANTIGENELE

Răspunsul imun de tip celular sau umoral este declanșat de pătrunderea antigenelor în organism. *Antigenul complet* sau *imunogenul* este o substanță străină care posedă

atât capacitatea de a reacționa specific cu anticorpii sau receptorii pentru antigen complementar (proprietăți *antigenice*) cât și capacitatea de a provoca apariția anticorpilor specifici sau a celulelor antigen-reactive efectoare (proprietăți *imunogene*).

Un antigen (imunogen) este alcătuit din două părți: o parte care reacționează specific cu anticorpii, numită *grupare determinantă*, *determinant antigenic* sau *epitop*, responsabilă de imunogenicitate și specificitate, și o a doua parte, care poartă gruparea determinantă denumită *purător*.

Haptena este un antigen incomplet care poate reacționa specific cu anticorpii dar nu poate provoca formarea acestora.

După originea lor antigenicele pot fi naturale, artificiale și sintetice. Antigenele *naturale* sunt produse de animale, plante și microorganisme. Ele pot fi solubile (proteine, polizaharide, acizi nucleici) sau insolubile (virusuri, bacterii, diverse celule etc.).

Antigenele *artificiale* sunt antigene naturale, cu rol de purtător, modificate chimic prin introducerea de grupări cu structură cunoscută.

Antigenele *sintetice* sunt polipeptide sintetizate în laborator prin polimerizarea unor derivați ai aminoacizilor.

În prezent, criteriul principal de clasificare a antigenelor ține cont de tipurile de celule, respectiv limfocite T și B, care pot fi stimulate de acestea. Astfel, antigenele sunt *timo-dependente* când pentru declanșarea reacțiilor imune sunt necesare limfocitele B dar mai ales limfocitele T și sunt *timo-independente* când antigenele pot declanșa sinteza de anticorpi de către limfocitele B și în absența unei cooperări cu limfocitele T.

Capacitatea unui antigen de a produce anticorpi este legată de anumite condiții care țin pe de o parte de natura chimică, greutatea moleculară, configurația spațială a moleculei și modul de inoculare a substanței respective în macroorganism și pe de altă parte de recunoașterea caracterului de "străin" al substanței, maturitatea imunologică, absența toleranței imunologice, absența paraliziei imunologice și existența unei viteze reduse de absorbție și eliminare a antigenului din partea receptorului.

În acest sens este cunoscut faptul că noul născut, în primele 3-4 săptămâni, nu poate produce anticorpi deoarece sistemul imunologic nu este suficient de dezvoltat. De asemenea, inocularea unui antigen în această perioadă de imaturitate imunologică poate duce la starea de "*toleranță imunologică*" și, în consecință, organismul nu va mai recunoaște substanța respectivă ca străină și la inoculări ulterioare nu va mai reacționa imunologic.

"*Paralizia imunologică*" poate fi observată la adulți dacă se inoculează parteral o cantitate foarte mare de antigen. Acest fenomen apare rar și este pasager.

Structura și rolul antigenelor microbiene sunt complexe și ele vor fi prezentate în detaliu în partea de microbiologie specială.

2.2. ANTICORPII (IMUNOGLOBULINELE)

Anticorpii sunt proteine plasmactice specializate (imunoglobuline) care reacționează specific cu antigenele care au stimulat producerea lor. Ei sunt efectorii moleculari principali ai sistemului imun umoral.

Molecula de imunoglobulină este compusă din patru lanțuri polipeptidice, două câte două identice, două lanțuri ușoare (L) și două lanțuri grele (H). Lanțurile sunt legate între ele în principal prin legături covalente S-S. Fiecare lanț polipeptidic conține o porțiune amino-terminală denumită regiune *variabilă* (V) și porțiune carboxil-terminală denumită regiune *constantă* (C). Partea moleculei de imunoglobulină care este responsabilă de funcția de anticorp, respectiv situsul său de combinare, este formată dintr-un număr mic de aminoacizi care sunt situați în regiunile variabile ale lanțurilor H și L.

Denumirea anticorpilor se face după tipul de reacție antigen-anticorp în care aceștia iau parte: *aglutinine, precipitine, opsonine, antitoxine, lizine, anticorpi blocanți, anticorpi fixatori de complement*.

Clasificarea anticorpilor se bazează pe mobilitatea lor electrolitică. Prin electroforeză globulinele serice se pot separa în 4 fracțiuni principale: *Alfa 1, Alfa 2, Beta, Gama sau imunoglobuline*.

Anticorpii se găsesc în fracțiunea gama a globulinelor. Această fracțiune se dividează la rândul său prin încălzură electrică diferită în 5 subfracțiuni care corespund celor 5 clase de imunoglobuline: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.

Caracterul de clasă al imunoglobulinelor este conferit de lanțurile H (γ = gama, α = alfa, μ = miu, δ = delta și ϵ = epsilon) care se deosebesc între ele prin secvența aminoacizilor care le conferă proprietăți antigenice distincte.

Clasa IgG reprezintă 75% din totalul imunoglobulinelor din serul uman normal. Moleculele de IgG apar după stimulul antigenic secundar și reprezintă principalii anticorpi neutralizanți, aglutinanți, opsonici, citotoxici, fixatori de complement.

Clasa IgA este alcătuită din două sisteme de imunoglobulină și anume din IgA serică care reprezintă 15-20% din totalul imunoglobulinelor serice și **IgA secretorie**, principală imunoglobulină din salivă, lapte, secreții nazale, bronșice și gastrointestinale.

Spre deosebire de molecula de IgA serică cu structură obișnuită, monomerică, molecula de IgA secretorie este formată din doi monomeri la care se adaugă o proteină suplimentară denumită "piesă secretorie".

Clasa IgM este formată din molecule sub formă de pentameri alcătuiți din cinci unități identice și reprezintă 5-10% din totalul imunoglobulinelor. IgM constituie anticorpii de răspuns primar, anticorpi ce apar după primul contact cu antigenul. Moleculele de IgM au o mare capacitate de aglutinare, precipitare sau liză. Această clasă de imunoglobuline este responsabilă de activitatea bactericidă a serului, în special de apărare imună mediată celular.

Clasa IgD

este formată din imunoglobuline cu o semnificație imunologică mai puțin importantă. Concentrația acestor imunoglobuline în ser este redusă (sub 1%).

Clasa IgE este constituită din anticorpi "reagineri". În momentul în care pătrunde în organism un alergen, anticorpii IgE fixați citorii îl recunosc specific ca antigen și astfel se transmit semnale la celulă care eliberează prompt, în cantități mari, amine necezi și permeabilizarea vaselor sanguine, generând simptomatologia clinică a hipersensibilității de tip imediat.

2.3. IMUNITATEA UMORALĂ

Pătrunderea unui antigen în organism este urmată de importante modificări celulare care preced apariția anticorpilor. La locul de pătrundere apar polimorfonucleare nucleofile. Urmează mobilizarea macrofagelor care inițiază răspunsul imunologic prin prelucrarea antigenului. Acesta este fagocitat și catabolizat până la structurile care dețin "informația antigenică". Antigenul astfel modificat se pare că se leagă de un ARN special.

Urmează faza de predare a informației antigenice-macrofag celulelor imunocompetente "limfocitele T și B".

După prelucrarea informației urmează o etapă activă de diferențiere a limfocitelor T și B. Acestea se transformă mai întâi în imunoblaste și ulterior prin diviziuni succesive în plasmocite mature și respectiv limfocite mici sensibilizate.

În această etapă celulele imunocompetente devin celule **imunoformatoare sau efectoare**, deoarece atât imunoglobulinele produse de plasmocit (efect umoral) ca și limfocitele specifice sensibilizate (efect celular) intervin direct sau vor media fenomene imunologice.

Limfocitele B se diferențiază în plasmocite și limfocite B cu memorie. **Plasmocitele** nu se mai divid. Ele produc imunoglobuline pe întreaga perioadă de viabilitate care este de numai 4-5 zile.

Limfocitele B cu memorie persistă o perioadă mare de timp și ele inițiază răspunsuri de tip secundar.

La un stimul primar plasmocitele răspund prin sinteză de anticorpi care apar în sânge după 8-10 zile. Într-o primă fază, acești anticorpi aparțin clasei IgM. Anticorpii se combină rapid cu antigenele care au provocat formarea lor și în majoritatea cazurilor conflictul se încheie în mod favorabil pentru organism. În activitatea anticorpilor antimicrobieni serici se înfălesc următoarele situații:

- Neutralizarea unui factor de patogenitate al germinului: anticorpi antitoxici neutralizanți antitetani, antidifterici, antistafilococici, antistreptococici etc.
- Opsonizarea. Prezența unei molecule de IgG la suprafața unei capsule sau a unui perete bacterian rezistent la ingestie, permite aderența la fagocit și înglobarea și distrugerea sa.

- Bacterioliza, provocată de fixarea imunoglobulinelor pe bacterie cu activarea complementului și perforarea pereții bacterian.

- Citoxicitatea celulelor, mediată de anticorpi. Fixarea microorganismelor pe anticorpii legați de unele celule, antrenează degranularea acestor celule (polinucleare neutrofile, bazofile sau eozinofile și mastocite), așa cum se întâmplă cu IgE fixat pe mastocite la subiecți atopici. Degranularea produce eliberare de histamină și alți mediatori chimici, cu consecințe de ordin patologic.

În general răspunsul umoral este dominat de opsonizare și este eficient față de bacteriile invazive cu multiplicare extracelulară, bacterii toxigene și bacterii neinvazive. Împotriva bacteriilor cu multiplicare intracelulară intervine răspunsul imunitar celular.

2.4. IMUNITATEA MEDIATĂ CELULAR

Răspunsurile imune mediate de celule și cele mediate de anticorpi nu pot fi strict separate, deoarece nici un răspuns mediat celular nu are loc în absența totală a anticorpilor iar în inițierea răspunsului în anticorpi sunt implicate diferite tipuri de celule. Totuși, în unele situații rolul principal de apărare revine imunității celulare (eliminarea celulelor devinute străine prin infecție) iar în alte situații acest rol revine imunității umorale (neutralizarea toxinelor și virusurilor).

Imunitatea celulară este realizată prin limfocite T, macrofage și alte celule țintă ale răspunsului imun (celule infectate, tumorale, de transplant).

Anticorpii celulari sunt reprezentați de limfocitele T specifice sensibilizate care au pe suprafața lor sedii de recunoaștere și cuplare specifică cu antigenul.

Celulele T specifice reactive sunt cuprinse în două clase majore:

- *Celule T-regulatorie* și

- *Celule T-efectoare*.

La rândul lor celulele T-regulatorie cuprind două subpopulații denumite *celule T-helper* (ajutătoare) și *celule T-citotoxice* (supresoare) după modul lor de acțiune, iar celulele *T-efectoare* constau la rândul lor din două subpopulații, *celule T-secretoare* de factori biologici activi (limfokine) și *celule citotoxice* (ucigașe) care determină moartea celulei țintă prin contact direct cu antigenele de pe membrana acesteia și inducerea unui efect biochimic citotoxic.

În afara acestor celule T, există și alte tipuri de celule care intervin în citotoxicitatea mediată celular și anume *celula K* (ucigașă), *celula NK* (nativ ucigașă) și *macrofagul activat*. Dintre acestea macrofagul activat are un rol esențial în imunitatea mediată celular, el fiind implicat în inițierea răspunsului imun prin preluarea și prezentarea antigenului, intervenția în reglarea răspunsului imun și participarea în faza efectoare a acestui răspuns în inflamație și distrugerea microbilor și celulelor tumorale.

2.5. APLICAȚII PRACTICE ALE IMUNOLOGIEI ÎN PATOLOGIA INFECTIOASĂ

Înșurirea noțiunilor de bază ale imunologiei generale permite înțelegerea și aprecierea mai corectă a importanței pe care o prezintă pentru practica medicală folosirea unor biopreparate (vaccinuri, antigene de diagnostic, seruri imune terapeutice și de diagnostic etc.) în profilaxia și tratamentul unor boli infecțio-contagioase, în diagnosticul imunologic și microbiologic de laborator.

În general, imunitatea poate fi dobândită *activ* sau *pasiv*.

2.5.1. Imunitatea activă

Este imunitatea dobândită prin stimularea directă a sistemului imunologic al gazdei de către un antigen. Imunizarea activă duce la formarea de anticorpi dar nu este totdeauna urmată de o imunitate de protecție.

La rândul său, imunitatea activă poate fi dobândită în mod *natural*, ca urmare a contactului cu germeni patogeni în cursul bolii sau poate fi dobândită *artificial* prin *vaccinare*. Acest tip de imunitate se instalează, în general, la 10-14 zile de la vaccinare și durează de la câteva luni la câțiva ani.

Vaccinurile pot fi definite ca produse biologice de natură microbiană cu proprietăți antigenice înalte și care prin inoculare în organismul uman sau animal determină producerea unei stări de imunitate activă specifică față de o anumită boală.

Primul vaccin, vaccinul variolic, a apărut cu aproape 200 ani în urmă datorită lui Jenner. După aproape 100 ani, Pasteur a preparat vaccinul antirabic și a deschis drumul elaborării de noi vaccinuri antivirale și antibacteriene.

Vaccinurile constituie una din cele mai valoroase metode în profilaxia bolilor infecțioase. Prin vaccinare s-a obținut scăderea spectaculoasă a incidenței unor afecțiuni grave (difteria, poliomielite, tetanosul etc.) iar în ultimii ani vaccinară a permis eradicarea variolei.

Un vaccin este cu atât mai valoros cu cât gradul de protecție este mai înalt, nocivitatea este mai mică și reacțiile adverse post-vaccinale mai reduse. De asemenea, valoarea unui vaccin este estimată prin reducerea morbidității în loturile vaccinate.

Vaccinurile, bacteriene sau virale, sunt utilizate în marea lor majoritate în scop profilactic. Există însă și cazuri când vaccinarea se face în scop terapeutic (vaccinare antistafilococică) sau alteori atât în scop profilactic cât și terapeutic (vaccinarea tetanică).

Primele vaccinuri au fost preparate din culturi de germeni vii, dar ulterior germeni au fost omorâți prin metode fizice (căldură) sau chimice (formol, fenol etc.) deoarece s-a observat că, dacă metodele de inactivare utilizează antigenele vaccinate, capacitatea de imunizare rămâne intactă în timp ce pericolul patogen este înlăturat. În cazul vaccinurilor antitoxice (tetanic, difteric) s-a procedat la transformarea toxinelor respective prin tratamente speciale fizico-chimice în anatoxine (formol-toxoid) netoxice, cu păstrarea calităților imunogene.

- Bacterioliza, provocată de fixarea imunoglobulinelor pe bacterie cu activarea complementului și perforarea pereții bacterian.

- Citoxicitatea celulelor, mediată de anticorpi. Fixarea microorganismelor pe anticorpii legați de unele celule, antrenează degranularea acestor celule (polinucleare neutrofile, bazofile sau eozinofile și mastocite), așa cum se întâmplă cu IgE fixat pe mastocite la subiecți atopici. Degranularea produce eliberare de histamină și alți mediatori chimici, cu consecințe de ordin patologic.

În general răspunsul umoral este dominat de opsonizare și este eficient față de bacteriile invazive cu multiplicare extracelulară, bacterii toxigene și bacterii neinvazive. Împotriva bacteriilor cu multiplicare intracelulară intervine răspunsul imunitar celular.

2.4. IMUNITATEA MEDIATĂ CELULAR

Răspunsurile imune mediate de celule și cele mediate de anticorpi nu pot fi strict separate, deoarece nici un răspuns mediat celular nu are loc în absența totală a anticorpilor iar în inițierea răspunsului în anticorpi sunt implicate diferite tipuri de celule. Totuși, în unele situații rolul principal de apărare revine imunității celulare (eliminarea celulelor devinute străine prin infecție) iar în alte situații acest rol revine imunității umorale (neutralizarea toxinelor și virusurilor).

Imunitatea celulară este realizată prin limfocite T, macrofage și alte celule țintă ale răspunsului imun (celule infectate, tumorale, de transplant).

Anticorpii celulari sunt reprezentați de limfocitele T specifice sensibilizate care au pe suprafața lor sedii de recunoaștere și cuplare specifică cu antigenul.

Celulele T specifice reactive sunt cuprinse în două clase majore:

- *Celule T-regulatorie* și

- *Celule T-efectoare*.

La rândul lor celulele T-regulatorie cuprind două subpopulații denumite *celule T-helper* (ajutătoare) și *celule T-citotoxice* (supresoare) după modul lor de acțiune, iar celulele *T-efectoare* constau la rândul lor din două subpopulații, *celule T-secrete* de factori biologici activi (limfokine) și *celule citotoxice* (ucigașe) care determină moartea celulei țintă prin contact direct cu antigenele de pe membrana acesteia și inducerea unui efect biochimic citotoxic.

În afara acestor celule T, există și alte tipuri de celule care intervin în citotoxicitatea mediată celular și anume *celula K* (ucigașă), *celula NK* (nativ ucigaș) și *macrofagul activat*. Dintre acestea macrofagul activat are un rol esențial în imunitatea mediată celular, el fiind implicat în inițierea răspunsului imun prin preluarea și prezentarea antigenului, intervenția în reglarea răspunsului imun și participarea în faza efectoare a acestui răspuns în inflamație și distrugerea microbilor și celulelor tumorale.

2.5. APLICAȚII PRACTICE ALE IMUNOLOGIEI ÎN PATOLOGIA INFECTIOASĂ

Înșurirea noțiunilor de bază ale imunologiei generale permite înțelegerea și aprecierea mai corectă a importanței pe care o prezintă pentru practica medicală folosirea unor biopreparate (vaccinuri, antigene de diagnostic, seruri imune terapeutice și de diagnostic etc.) în profilaxia și tratamentul unor boli infecțio-contagioase, în diagnosticul imunologic și microbiologic de laborator.

În general, imunitatea poate fi dobândită *activ* sau *pasiv*.

2.5.1. Imunitatea activă

Este imunitatea dobândită prin stimularea directă a sistemului imunologic al gazdei de către un antigen. Imunizarea activă duce la formarea de anticorpi dar nu este totdeauna urmată de o imunitate de protecție.

La rândul său, imunitatea activă poate fi dobândită în mod *natural*, ca urmare a contactului cu germeni patogeni în cursul bolii sau poate fi dobândită *artificial* prin *vaccinare*. Acest tip de imunitate se instalează, în general, la 10-14 zile de la vaccinare și durează de la câteva luni la câțiva ani.

Vaccinurile pot fi definite ca produse biologice de natură microbiană cu proprietăți antigenice înalte și care prin inoculare în organismul uman sau animal determină producerea unei stări de imunitate activă specifică față de o anumită boală.

Primul vaccin, vaccinul variolic, a apărut cu aproape 200 ani în urmă datorită lui Jenner. După aproape 100 ani, Pasteur a preparat vaccinul antirabic și a deschis drumul elaborării de noi vaccinuri antivirale și antibacteriene.

Vaccinurile constituie una din cele mai valoroase metode în profilaxia bolilor infecțioase. Prin vaccinare s-a obținut scăderea spectaculoasă a incidenței unor afecțiuni grave (difteria, poliomielite, tetanosul etc.) iar în ultimii ani vaccinară a permis eradicarea variolei.

Un vaccin este cu atât mai valoros cu cât gradul de protecție este mai înalt, nocivitatea este mai mică și reacțiile adverse post-vaccinale mai reduse. De asemenea, valoarea unui vaccin este estimată prin reducerea morbidității în loturile vaccinate.

Vaccinurile, bacteriene sau virale, sunt utilizate în marea lor majoritate în scop profilactic. Există însă și cazuri când vaccinarea se face în scop terapeutic (vaccinare antistafilococică) sau alteori atât în scop profilactic cât și terapeutic (vaccinarea tetanică).

Primele vaccinuri au fost preparate din culturi de germeni vii, dar ulterior germeni au fost omorâți prin metode fizice (căldură) sau chimice (formol, fenol etc.) deoarece s-a observat că, dacă metodele de inactivare utilizează antigenele vaccinate, capacitatea de imunizare rămâne intactă în timp ce pericolul patogen este înlăturat. În cazul vaccinurilor antitoxice (tetanic, difteric) s-a procedat la transformarea toxinelor respective prin tratamente speciale fizico-chimice în anatoxine (formol-toxoid) netoxice, cu păstrarea calităților imunogene.

6. REACȚIA DE SERONEUTRALIZARE

În reacția de seroneutralizare, antigenul specific biologic activ se combină cu anticorpii corepunători, conducând la neutralizarea (blocarea) proprietăților biologice agresive, metabolice, de multiplicare etc. ale diferitelor antigene.

În principiu, reacția de seroneutralizare se desfășoară în doi timpi. Inițial se pun în contact antigenul (toxina, virusul) cu serul imun neutralizant ce conține anticorpi anihilanți (antitoxine, antivirali). După o perioadă de incubare, timp în care se formează imunocomplexele specifice, urmează inocularea amestecului la un animal sensibil, observându-se prezența sau absența efectului biologic specific.

În situația corespondenței celor doi imunoreactanți din amestec, efectul biologic specific al antigenului nu se produce, de unde rezultă că proprietatea biologică a antigenului a fost neutralizată de către anticorpii neutralizanți specifici din serul imun, deci gazda sensibilă rezistă inoculării. Dacă nu există corespondență între antigen și anticorp, antigenul biologic activ, în funcție de natura acestuia, va produce anumite efecte pe substratul celular indicator (intoxicarea animalului, apariția efectului citopatic pe culturi de țesut etc.).

Cap. XII. EPIDEMIOLOGIA BOLILOR TRANSMISIBILE

Epidemiologia este o ramură de bază a medicinei. Pe scurt ea poate fi definită ca știința care se ocupă cu studiul prevenirii și combaterii bolilor cu extindere în masă.

Accești îmbolnăviri pot fi provocate de agenți infecțioși (bacterii, virusuri, paraziți) dar și de agenți neinfecțioși (toxici, genetici etc.). Prin urmare, astăzi, epidemiologia se ocupă, pe lângă manifestările extensive ale bolilor infectocontagioase, și cu alte manifestări morbide, de masă, neinfecțioase, cum sunt bolile cardiovasculare, bolile degenerative, tumorile genetice, tulburări psihice, malformații congenitale etc.

Studiul procesului apariției și răspândirii bolilor transmisibile în colectivități umane, a *procesului epidemiologic*, ajută la înțelegerea cauzelor care au generat acest proces și prin aceasta, la elaborarea unor măsuri adecvate de prevenire (profilaxie) și combatere (stingera propagării).

Procesul epidemiologic cuprinde totalitatea factorilor care determină sau favorizează apariția bolilor, extinderea, persistența sau stingera lor în cadrul colectivităților umane.

Accești factori se împart în factori *determinanți*, principali și factori *favorizanți*.

Cei trei factori epidemiologici determinanți sunt: *izvorul de infecție* (om, animale, insecte), *căile de transmitere* (apă, aer, sol, obiecte, alimente, mâini murdare, vectori) și *populația receptivă*. Acești trei factori principali formează inelul procesului epidemiologic și prezența lor condiționează în mod obligatoriu apariția și răspândirea unei boli infecțioase.

Factorii favorizanți se împart la rândul lor în factori *naturali* (climatici, geografici) și *economico-sociali* (nivelul cultural, igienico-sanitar etc.).

1. IZVORUL DE INFECȚIE

Izvorul epidemigen sau sursa de infecție constituie sursa care generează și elimină în mediul înconjurător diverși agenți patogeni. Izvorul de infecție poate fi reprezentat de oameni sau animale *bolnavi* sau *purători de germeni*.

Cel mai periculos izvor de infecție este constituit de sursele de infecție necunoscute (purători sănătoși de germeni patogeni, infecții inaparente, boli atipice, nediate, diagnosticate, bolnavi în perioada de incubație etc.). De asemenea este important de cunoscut căile de eliminare ale agenților patogeni (respirație, digestivă, mucoase și tegumente, sânge etc.) pentru a se putea lua cele mai eficiente măsuri de împiedicare a răspândirii și de neutralizare a acestor agenți.

Aria pe care acționează sursa de infecție poartă numele de *focar epidemic*.

2. CĂILE ȘI MECANISMELE DE TRANSMITERE ALE AGENȚILOR INFECȚIOȘI

Contaminarea și infectarea unui organism receptiv se poate realiza prin mecanisme *directe* sau *indirecte*.

În cazul *transmiterii directe* infectarea organismului receptiv se poate realiza prin

inhalarea de particule, pe cale cutanată sau prin mucoase (mușcătură, sărut), contact sexual, infecție neonatală, transplacentar, transfuzii de sânge sau plasmă contaminate.

Transmiterea indirectă a bolilor se face prin intermediul aerului (difteria, gripa, scarlatina, tuberculoza etc.), apei (febrele tifo-paratifoide, dizenteria, holera, hepatita A, poliomielița etc.), solului (tetanos, poliomieliță, salmoneloze, tuberculoză, parazitoze etc.), alimente (trichineloză, tuberculoză, antraxul, bruceloză, salmoneloze etc.), diverse obiecte (salmoneloze, tuberculoză, hepatita A, parazitoze), mâini murdare (febră tifoidă, dizenteria, hepatită A, stafilococii, tuberculoză etc.) sau vectori (păduche – tifos exantematic, țânțar – malarie, căpușă – febra recurentă etc.).

3. STAREA DE RECEPTIVITATE A POPULAȚIEI

Pentru declanșarea unei epidemii este necesar ca, pe lângă izvorul generator de infecție și căi de transmitere favorabile, să existe și oameni receptivi, a căror capacitate de apărare nu rezistă la agresiunea agentului patogen.

Gradul de receptivitate al unei populații depinde de rezistența naturală la infecție, de vârstă, alimentație, profesie etc., dar mai ales, și acesta este decisiv pentru unele boli infecto-contagioase (difterie, tetanos, poliomieliță, rujeolă, tuberculoză etc.), de vaccinarea profilactică efectuată corect.

4. FORME DE MANIFESTARE A PROCESULUI EPIDEMIOLOGIC

Manifestările procesului epidemiologic sunt în mod obișnuit evaluate după incidența și prevalența îmbolnăvirilor într-o colectivitate. Bolile transmissibile se pot răspândi într-o anumită populație în funcție de spațiu, timp, configurație demografică etc. sub formă de îmbolnăviri sporadice, endemice, epidemice și pandemice.

În manifestarea **sporadică** procesele morbide apar sub forma unui număr mic de îmbolnăviri distribuite pe un teritoriu întins și înregistrate la intervale mari de timp și fără o legătură aparentă între ele.

În **morbiditatea endemică**, bolile transmissibile se întâlnesc în mod constant în anumite grupe de populații, din unele zone geografice, sub formă de cazuri dispersate care periodic pot crește ca frecvență (hepatita virală, dizenteria bacilară etc.).

Prin luarea unor măsuri eficiente, o morbiditate endemică se poate transforma într-o morbiditate sporadică sau chiar poate fi eradicată pe teritorial respectiv. Sunt însă și situații când morbiditatea endemică se poate transforma într-o morbiditate endemo-epidemică.

Morbiditatea epidemică relevă o situație critică în care apare într-un interval de timp scurt un număr mare de cazuri de îmbolnăvire grupate în focare cu legături epidemiologice între ele (epidemii hidrice, epidemii aerogene, epidemii alimentare etc.).

Morbiditatea pandemică

Pandemia presupune apariția unui număr mare de cazuri de boală într-o anumită

perioadă de timp, la populația din arii geografice extinse, reprezentând țări, continente sau întreg globul. Între cazurile de îmbolnăvire există legături evidente.

5. PROFILAXIA ȘI COMBATAREA BOLILOR TRANSMISIBILE

Principalele aspecte ale sistemului de măsuri profilactice și de combatere a bolilor transmissibile au în vedere acțiuni asupra celor trei verigi ale lanțului epidemiologic și anume: măsuri față de izvoarele de infecție, acțiuni asupra căilor și mecanismelor de transmitere ale infecției și creșterea rezistenței specifice și nespecifice a masei receptivă.

Măsurile privind sursa sau izvorul de infecție se adresează bolnavilor, contactilor și mai ales purtătorilor de germeni. Depistarea bolnavilor cu forme clinice tipice sau atipice se face fie în mod activ, prin depistarea medicului și a altor cadre sanitare în focarele de boli transmissibile, în mod organizat, fie în mod pasiv, prin prezentarea bolnavului la medic. În vederea întreruperii lanțului epidemiologic, bolnavii sunt izolați în spitalele de boli contagioase sau, în anumite situații și în anumite condiții, la domiciliu. Transportul bolnavilor la spital se face cu autosalvarea iar eliberarea din spital se face după vindecare și stabilirea unei eventuale stări de purtător (excretor de germeni).

În funcție de gravitatea și potențialul lor epidemiologic, bolile contagioase se încadrează conform normelor internaționale în două categorii: A și B. Bolile din grupa A sunt înregistrate într-un formular special și sunt declarate nominal Centrelor de Medicină Preventivă sau, în anumite cazuri, direct Ministerului Sănătății. Raportarea bolilor din grupa B se face numeric.

Contactii bolnavului, adică persoanele care au îngrijit bolnavul la domiciliu, au locuit împreună cu bolnavul în condiții care ar fi putut face posibilă contaminarea lor sau persoanele care au venit în contact cu bolnavul în perioada de contagiozitate a bolii vor fi supravegheați clinic (inclusiv termometrizare) și prin probe de laborator pe întreaga perioadă de incubare a bolii respective pentru depistarea unor eventuale noi cazuri de îmbolnăvire.

Măsuri speciale trebuie luate față de purtătorii de germeni, ei fiind cel mai frecvent izvor de infecție incriminat în declanșarea unor epidemii.

Stabilirea stării de purtător de germeni se face prin probe microbiologice specifice de laborator. În scopul de a-i face inofensivi pentru colectivitatea în care trăiesc și nimeni să nu se lase măsuri adecvate mergând până la schimbarea obligatorie a locului de muncă.

Măsuri privind calea de transmitere se realizează prin dezinsecție, dezinsecție și deratizare. La acestea se mai adaugă acțiuni igienico-sanitare și gospodărești în vederea asanării mediului înconjurător.

Măsurile privind creșterea rezistenței masei receptivă constau în folosirea unor mijloace specifice și nespecifice.

Profilaxia specifică permite creșterea rezistenței organismului față de un anumit

agent patogen și ea se realizează prin imunizarea activă cu ajutorul vaccinurilor, imunizarea pasivă cu seruri imune specifice sau imunoglobuline, și chimioprofilaxia cu antibiotice sau chimioterapice.

Profilaxia nespecifică cuprinde măsuri referitoare la igiena personală și a mediului ambiant, alimentație rațională, evitarea surmenajului etc.

Principala metodă de lucru în activitatea epidemiologică este *ancheta epidemiologică*, care studiază procesul epidemiologic de la apariție până la stingere precum și măsurile ce au fost luate pentru limitarea și stingerea focarului epidemic. Ancheta preliminară este efectuată de cadrele sanitare medii și ea urmărește depistarea precoce a bolnavilor și contacților, diagnosticul prezuntiv, culegerea de date privind sursa infectantă, data și locul contactului infectant, raportarea cazului și instituirea măsurilor sanitaro-antiepidemice de urgență: izolarea bolnavului, dezinsecția și dezinsecția.

Ancheta epidemiologică definitivă este făcută de medicul epidemiolog și are ca obiectiv cunoașterea cât mai completă a verigilor lanțului epidemiologic, elaborarea unui plan complet de măsuri entiepidemice care să anihileze focarul epidemic pe fiecare verigă în parte, precum și aplicarea eficientă a acestor măsuri.

MICROBIOLOGIA SPECIALĂ

Cap. XIII. COCII GRAM-POZITIVI

Clasificarea sistematică a germeniilor a fost adoptată prima oară în 1930 cu ocazia primului Congres Internațional de Microbiologie ținut la Paris și ca a fost mereu îmbunătățită cu ocazia congreselor care au urmat.

În clasificarea germeniilor s-a ținut seama de asemănarea pe baza unor caractere comune, care le înudește.

Cei mai mulți germeni întâlniți în patologia medicală fac parte din clasa *Schizomycetales* ordinul *Eubacteriales*.

Cocii Gram-pozitivi mai importanți se încadrează în: genul *Staphylococcus*, genul *Streptococcus* și genul *Diplococcus*.

1. STAFILOCOCCUL (*STAPHYLOCOCCUS* SP.)

În sistematica bacteriană, stafilococul este situat în familia *Micrococcaceae*.

Habitat. Foarte răspândit în natură, stafilococul saprofit se întâlnește în aer, apă, pământ, pe legume și în cavitățile naturale ale oamenilor și animalelor, făcând parte din flora normală a acestora. În afara celor saprofite, se găsesc și stafilococi potențial patogeni în rinofaringele și intestinelor oamenilor sănătoși, într-un procentaj de 50%. Aceștia, eliminați prin tuse, strănut sau prin dejecte, pot provoca, atunci când întâlnesc organisme sensibile, îmbolnăviri variate.

Caractere morfotactice. Stafilococii sunt germeni sferici, cu diametrul de 0,8 μ , dispuși în grămezi neregulate, amintind ciorchinele de strugure, de unde și numele dat (în grecește, stafîlos = strugure).

Dispoziția aceasta caracteristică se întâlnește pe frotiul făcut din cultura pe medii solide. Sunt imobili, necapsulați, nesporulați. Se colorează Gram-pozitiv. În culturile vechi sau sub influența antibioticelor pot apărea Gram-negativ.

Caractere de cultură. Crește pe medii uzuale. Pe geloză coloniile sunt rotunde, cu diametrul de 1-2 mm, cu marginile regulate. Incolore la început, se colorează apoi, datorită unui pigment, distingându-se trei variante: stafilococul *alb*, *citrin* și *auriu*. Pigmentul rămâne cantonal în colonie, mediul fiind nemodificat. Pigmentogeneza este favorizată de unele medii de cultură, printre care se menționează: mediul cu cartof, serul coagulat

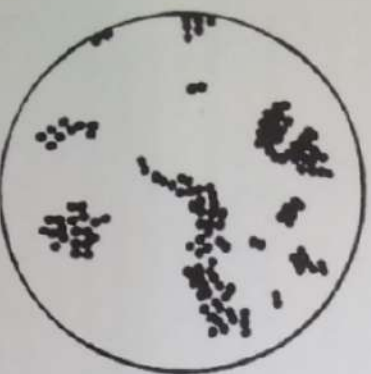


Fig. 15. Stafilococ.

sau geloză cu adaos de 10% lapte, ca și de lumină și oxigen. În laborator, ultimele două deziderate se realizează lăsând culturile 1-2 zile la temperatura laboratorului. Pe mediile lichide tulbură uniform bulionul.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerob și facultativ anaerob, se dezvoltă la 37°C. Prezența CO₂ în proporție de 20% favorizează producerea de pigment și de toxină. Fermentează unele zaharuri, fermentarea mamei fiind socotită un test de patogenitate. Se poate dezvolta pe medii cu o cantitate mare de sare (7,5g%), proprietate ce permite izolarea stafilococilor dintr-o asociație microbiană.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. Stafilococul este un germene rezistent. Rezistă 60 min. la 60°C. În produsele uscate rezistă câteva luni. Sublimatul 1% îl omorâă în 10 min., iar alcoolul de 70° în 60 min. Inițial sensibil la antibiotice, stafilococii au devenit ulterior din ce în ce mai rezistenți. Coloranții de anilină, în unele concentrații, au acțiune bacteriostatică sau chiar bactericidă asupra stafilococilor, fapt pentru care adăugarea acestor substanțe la unele medii de cultură permite selecționarea germeniilor asociați.

Caractere de patogenitate. Stafilococii patogeni își dădorează această proprietate pe de o parte, virulenței, iar pe de alta, unor toxine pe care le elaborează.

În cadrul virulenței trebuie citate unele enzime secretate de stafilococi, printre care: - coagulaza, enzimă cu ajutorul căreia germeul, prin coagularea plasmei în organism, își creează un înveliș de fibrină, punându-se astfel la adăpostul acțiunii fagocitare. Ea este prezentă la 98% din stafilococii patogeni;

- fibrinolizina, enzimă cu ajutorul căreia lizează rețeaua de fibrină;

- hialuronidaza, enzimă care, prin desfacerea acidului hialuronic, permite difuzarea infecției în organism.

Stafilococii elaborează exotoxine cu multiple activități. De luat în considerație este activitatea hemolitică exercitată de mai multe hemolizine. Hemolizina alfa este cea mai bine studiată, prezența ei fiind socotită indice de patogenitate. Produce liza totală a hematiilor diferitelor specii animale la 37°C.

Enterotoxina este un alt produs toxic al stafilococului, care se deosebește de celelalte toxine atât prin rezistența la căldură - rezistă 30 min. la 100°C -, cât și antigenic. Administrată per os la voluntari umani, provoacă simptomele intoxicației alimentare cu stafilococi: vărsături, crampe abdominale, greață, ameteală, prostrare. Tratăată cu formol 4% și ținută la termostat își pierde după 10-14 zile proprietățile toxice, păstrând însă nealinate proprietățile antigenice. Se transformă în anatoxină.

Boala la om. Afecțiunile provocate de stafilococi patogeni sunt foarte variate. Pe primul plan se situează leziuni cutanate, al căror tip reprezentativ este furunculul, dar și folliculite superficiale și infecții ale glandelor sudoripare din axilă. Poate trece în sânge și determină septicemii și septicopiemii cu localizări vizcerale. Asociat cu alți germeni, stafilococul poate juca un rol în bronhopneumonii, sinuzite și otite și este cel mai frecvent germene de suprainfecție a plăgilor și tuturor leziunilor deschise. Tulburările care elaborează enterotoxină provoacă intoxicații alimentare. În urma administrării de antibiotice poate apare enterita stafilococică.

Tratamentul În afara antibioticelor și a chimioterapicelor, se întrebuintează vaccinul, autovaccinul și anatoxina stafilococică.

Imunitatea. Poate fi naturală (pielea, mucoasele și unii factori umorali jucând un rol important) și dobândită. Cea dobândită poate fi antitoxică sau antimicrobiană și poate fi stimulată prin administrare de vaccin sau anatoxină stafilococică.

Diagnosticul de laborator. În infecțiile stafilococice, diagnosticul de laborator este în principiu bacteriologic. Având în vedere larga răspândire a stafilococilor în natură, nu este suficient să se izoleze un stafilococ din produsul patologic, ci trebuie să se demonstreze și patogenitatea acestuia. Pentru același considerent, recoltarea produsului patologic trebuie făcută cu toată grija pentru a evita contaminările cu tulpini saprofite de pe piele sau din mediul înconjurător.

În cazul colecțiilor închise recoltarea se va face prin puncție, după aseptizarea tegumentelor. Dintr-o leziune deschisă recoltarea se va face cu tamponul, ansa sau pipeta Pasteur, iar în afecțiunile nasofaringiene, cu tamponul. Probele vor fi trimise cât mai repede la laborator în condiții corespunzătoare.

Examenul puroiului provenind din colecții închise. Acest examen constă din:

- examenul macroscopic, care va arăta un puroi gros, cremos,
- examenul microscopic, care va începe cu efectuarea unui frotiu care va fi colorat Gram. Acesta, examinat cu imersie, va arăta polinucleare neutrofile mai mult sau mai puțin alterate și coci Gram-pozitivi, izolați, în diplo, în lanțuri sau grămezi mici. Această dispoziție nefiind caracteristică stafilococului, întrucât și alți coci Gram-pozitivi pot avea această prezentare, se va trece obligatoriu la etapa următoare, înșămânțând produsul pe medii solide și lichide, medii ce vor fi termostatate la 37°C. Întrucât de cele mai multe ori, după 24 de ore, culturile sunt bine dezvoltate, acestea vor fi examinate, notând informațiile furnizate.

Froturile făcute din coloniile de pe geloză vor pune în evidență, de astă dată, coci Gram-pozitivi în grămezi mari, deci cu dispoziția caracteristică de ciorchine.

Examenul puroiului provenind din leziuni deschise. În această situație, întrucât în mod inevitabil stafilococul căutat va fi asociat cu o serie de alți germeni, activitatea de laborator va fi diferită, ea urmărind, în primul rând, izolarea stafilococului în cultură pură.

Pentru aceasta, produsul va fi suspensionat într-o cantitate cunoscută de apă distilată, care, apoi, va fi înșămânțată într-o cantitate egală de mediu hipercolorat lichid. Mediul care, inițial, are o concentrație de 15 g% NaCl ajunge, prin înjumătățire cu apă distilată, la concentrația de 7,5%, într-un astfel de mediu se dezvoltă numai stafilococi, toți ceilalți germeni asociați fiind în imposibilitate de a supraviețui. Mediul înșămânțat va fi termostatat 36 h la 37°C, după care se fac treceri pe mediul hipercolorat solid, urmărindu-se obținerea de coloni izolate prin metoda epuizării. Mediul este cunoscut sub numele de mediul Chapman. Este o geloză care conține 7,5 g% NaCl, manită și roșu fenol ca indicator. Mediul înșămânțat este termostatat 24 h. Întrucât produsul de cercetat este suprainfectat și alături de stafilococi responsabili de producerea stării de boală pot exista și stafilococi nepatogeni, pe

mediul Chapman se vor obține două feluri de colonii: unele roz-roșcate, produse de stafilococi care nu au fermentat manita – manitonegativi – și colonii galbene, produse de stafilococi care, fermentând manita, acidifică mediul și, în consecință, acesta își schimbă culoarea – manitopozitivi.

Stafilococi izolați în cazul colecțiilor închise, sau stafilococi manitopozitivi, în cazul leziunilor deschise, sunt supuși unor teste pentru a stabili caracterile de patogenitate.

Aceste teste sunt:

- **Producerea de pigment.** Germenul înșămânțat pe medii cu ser coagulat este lăsat după termostatare 48 h pe masă la temperatura camerei. În acest interval de timp vor apare coloniile pigmentate.

- **Cercetarea coagulazei.** Într-o eprubetă de hemoliză se adaugă peste 0,3 ml plasmă oxalată, 0,2 ml din cultura în builon de 24 h a stafilococului de cercetat. Eprubeta se introduce la 37°C și se urmărește, din 30 în 30 min, timp de 4 h, apariția cheagului.

- **Cercetarea fibrinolizei.** La 7 părți de geloză topită și răcită la 50°C se adaugă o parte plasmă oxalată, se amestecă, se încălzește 5 min la 56°C și apoi se toarnă în plăci. Mediul este opac datorită rețelei de fibrină. Se înșămânțează izolat tulpinile de cercetat. În jurul coloniilor fibrinolizo-pozitive se constată apariția unei zone clare, prin lizarea fibrinei din mediu.

- **Cercetarea hemolizei.** Tulpina de cercetat se înșămânțează pe o placă cu geloză - sânge. După 24 h poate apărea o liză totală, completă, cu marginile bine delimitate (hemolizina alfa) sau o zonă de hemoliză cu limite neprecise, care se clarifică la rece (hemolizina beta).

- **Fermentarea manitei.** În afara posibilității oferite de mediul Chapman, tulpina de cercetat mai poate fi înșămânțată și într-un tub cu apă peptonată manită 1% cu albastru de bromtimol ca indicator. Stafilococul manitopozitiv virează mediul în galben.

În cazul cercetării stafilococului în exsudatul faringian, în vărsături sau în materiale fecale, tehnica de laborator va fi cea expusă la leziunile deschise.

În cazul hemoculturii, sângele va fi recoltat cu mare atenție, de preferat cu dispozitiv în circuit închis, în builon, în proporție de 10%. Este de dori repetarea probei, pentru că sunt necesare cel puțin două hemoculturi pozitive cu același tip de stafilococ pentru a afirma diagnosticul de septicemie stafilococică.

Când este vorba de toxinfecție alimentară, va trebui ca investigațiile să privească atât alimentele incriminate, cât și vărsăturile și fecalele bolnavului.

S-a crezut inițial că numai stafilococi cu testele de patogenitate pozitive sunt răspunzători de producerea toxinfecțiilor alimentare. Cercetările efectuate au arătat că nu este nici o legătură între aceste caractere și enterotoxina, pentru că și stafilococi albi, coagulazo-fibrinolizo- și hemolizonegativi pot fi responsabili de producerea toxinfecției alimentare.

Epidemiologie. Sursa de infecție este reprezentată de omul bolnav, în special de

cel cu leziuni deschise, dar și de purtători sănătoși. Transmiterea poate fi directă, dar și indirectă, prin aer, praf, lenjerie.

Infecțiile stafilococice pun astăzi epidemiologiei probleme noi, datorită apariției tot mai numeroase a variantelor rezistente la chimioterapie și antibiotice.

În mediul spitalicesc, determinările de laborator făcute au arătat că, spre deosebire de restul mediului, proporția de stafilococi rezistenți la antibiotice este de peste 75%.

Această proporție alarmează, întrucât cifra personalului medical din spital, purtători sănătoși, care pot vehicula și întreține infecțiile cu stafilococi rezistenți, este uneori foarte mare. Rolul acestui procentaj este esențial din punct de vedere epidemiologic, în special în serviciile de chirurgie, terapie intensivă și maternitate.

În serviciile de chirurgie, intervențiile mari pot fi compromise prin infectarea pacientului cu stafilococi rezistenți, din mediul înconjurător. În același serviciu, prin administrarea, de multe ori nemotivată, a unor cantități masive de antibiotice, înainte, în timpul și mai ales după operație, se poate rupe echilibrul normal al florei intestinale și un stafilococ rezistent poate declanșa o enterită care, dacă nu este sesizată la timp, duce la accidente grave.

În serviciile de maternitate, mortalitatea cea mai ridicată este provocată de stafilococ. Având în vedere rezistența scăzută a nou-născutului, rolul nociv al unui purtător de stafilococ patogen în rândul personalului din această secție este evident. De asemenea, problema toxinfecțiilor alimentare cu stafilococ trebuie să rețină atenția din punct de vedere epidemiologic, prin ușurința cu care pot fi provocate și, în special, prin rolul pe care îl are purtătorul, de cele mai multe ori sănătos, fără manifestări clinice aparente.

2. STREPTOCOCCUL (STREPTOCOCCUS SP.)

Streptococul face parte din familia *Streptococcaceae*, genul *Streptococcus*, și cuprinde mai multe specii, unele patogene, altele saprofite.

Habitat. Foarte răspândit în natură, este întâlnit pe tegumente și în cavitățile naturale ale omului și ale animalelor.

Caractere morfotictoriale. Germenii sunt sferici sau ușor ovalari, cu diametrul în jur de 1μ. Sunt dispuși uneori în diplo-, însă frecvent în lanțuri a căror lungime este în funcție de specie. Sunt nesporulați, imobili, Gram-pozitivi. În condiții defavorabile de mediu și în culturile vechi își pot pierde afinitatea pentru Gram.

Caractere de cultură. Sunt germeni care se dezvoltă greu pe medii uzuale. Pe geloză-sânge coloniile sunt mici, opace, pulverulente. În 1903, Schottmüller clasifică streptococii, după modul cum se comportă pe mediu cu sânge, în patru categorii:

- streptococii beta-hemolitici, care produc o zonă de hemoliză totală, bine delimitată;
- streptococii alfa-hemolitici sau viridans, care prezintă o zonă de hemoliză verzuie;

- streptococii alfa-prin-hemolitici, care produc o zonă de hemoliză incompletă, unele hematii rămânând intacte;

- streptococii gamma, care sunt nehemolitici și, de cele mai multe ori, de origine animală.

Caractere biochimice și de metabolism. Streptococii sunt în general aerobi, însă sunt și tulpini strict anaerobe. Nu sunt sensibili la acțiunea bilei și a sărurilor biliare. Fermentează o serie de zahăruri cu producere de acid, fără însă a produce gaz. Creșterea și multiplicarea lor necesită prezența unor factori indispensabili, printre care: glutamina, acidul pantotenic, vitamina B₆, riboflavină etc. Acești factori de creștere sunt aduși în mediu prin introducerea de lichide organice: sânge, ser, ascită.

Rezistență. Indiferent de specie, streptococii sunt distruși la 60°C în 60 min. Apa oxigenată 3%, sublimatul 1/200-1/2000, fenolul 2-5%, tinctura de iod 1/2000, ca și detergenții cationici omorâă streptococii destul de repede. Sunt rezistenți la coloranții de trifenilmetan. Toate speciile, cu excepția enterococului, sunt sensibile la sulfamide. Streptococul beta-hemolitic este foarte sensibil la penicilină.

Structura antigenică. Pe baza unei fracțiuni specifice - un polizaharid - streptococii se împart în 17 grupe, notate de la A la S (lipsește I și J), grupe care pot fi identificate cu ajutorul unei reacții de precipitare. Streptococii patogeni pentru om fac parte din grupa A.

Caractere de patogenitate. Streptococii care prezintă capacitatea patogenă cea mai marcată sunt cei piogeni. Patogenitatea lor este conferită de virulență și toxigenă. Streptococii elaborează mulțiplici factori toxici. În acest cadru trebuie amintită toxina eritrogenă, numită și toxina scarlatină sau toxina Dick, care, inoculată intradermic la indivizi sensibili, provoacă apariția erupției cutanate caracteristice din scarlatină.

Un alt factor toxic care trebuie reținut este streptolizina O, factor care manifestă acțiune litică asupra hematiilor. Streptolizina O este antigenică, antistreptolizinele O putând fi puse în evidență în diferite afecțiuni streptococice.

Boala la om. Streptococii determină numeroase și foarte variate afecțiuni: impetigo, erizipel, adenite, angine (de exemplu cea scarlatină), faringite, sinuzite, pleurezii, bronhopneumonii, peritonite, pericardite, endocardite, artrite, febra puerperală, abcese, flegmoane, flebite, infecții urinare, septicemii.

Tratamentul. În afara de antibiotice și chimioterapie, se întrebuintează vaccinoterapia sau seroterapia cu ser antitoxic. În cazul streptococilor hemolitici din grupul A, penicilina va fi suficientă.

Imunitatea. Imunitatea antistreptococică este de natură antimicrobiană și antitoxică. Cea antimicrobiană este specifică de tip. Datorită faptului că sunt mai multe tipuri de streptococi, se explică posibilitatea ca indivizii să facă repetate infecții streptococice. Imunitatea antitoxică este durabilă, fapt demonstrat de observația că 95% dintre scarlatinoși nu fac boala decât o dată. Această imunitate se poate câpăta și natural, prin contacte repetate cu cantități mici de germeni, sau artificial, prin administrare de anatoxină.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul în diferite afecțiuni produse de streptococi poate fi: bacteriologic, serologic și biologic.

- **Diagnosticul bacteriologic.** Acest examen vizază izolarea și identificarea germinului. Recoltarea se va face în condiții de sterilitate și, de dorit, înaintea începerii tratamentului. Cunoșcând sensibilitatea deosebită a streptococului beta-hemolitic la acțiunea penicilinei, este explicabil de ce în laborator frecvența cu care acest germin este izolat din afecțiuni cert streptococice este mult inferioară realității. Bolnavii ajung să fie investigați bacteriologic, de cele mai multe ori, după începerea tratamentului medicamentos.

Având în vedere că frotiul efectuat din produsul patologic nu este concludent, obligatoriu acest produs va fi însămânțat pe medii de cultură îmbogățite. Mediul cel mai folosit este geloza-sânge. El se prepară din geloză 3%, la care se adaugă, atunci când, răcindu-se, a ajuns la 50°C, sânge defibrinat de berbec în proporție de 5-10%, în condiții de sterilitate. Întrucât în foarte multe produse patologice - din leziuni și cavități - streptococul este însoțit de stafilococ, mediului i se va adăuga cristal violet 1/500.000 pentru inhibarea sa selectivă. Atunci când este streptococ hemolitic, raportul dintre hemoliză și colonie este în favoarea hemolizei.

Coloniiile suspecte sunt trecute fiecare în câte un tub cu bulion glucozat. După termostatare streptococii se vor depune sub formă de grunji flocoși la fundul tubului, mediul rămânând limpede. Frotiul făcut din această cultură va arăta germeni cu dispoziția caracteristică în lanțuri.

Identificarea streptococilor piogeni - grupa A - se poate face în afara reacției de precipitare cu serul de grupa A și printr-o metodă simplă, accesibilă oricărui laborator, "metoda cu bacitracină". Pe o plăcă cu geloză-sânge se însămânțează în pânză streptococul de identificat și în mijlocul aței se pune o rondelă îmbibată în soluție de bacitracină 5 u/ml. Se incubează 24 h. Streptococii din grupa A, fiind inhibați de bacitracină, nu se vor dezvolta în jurul rondelii cu antibiotic.

Identificarea enterococului se face prin însămânțare pe un mediu cu 6,5% NaCl și pH 9,6, mediu pe care crește electiv, iar cea a streptococului viridans pe baza zonei de hemoliză verzuie și prin reacția de biloliză.

- **Diagnosticul serologic.** Acest diagnostic se face prin două reacții care urmăresc punerea în evidență a unor anticorpi antistreptococi. Prima este cunoscută sub numele de ASLO și urmărește prezența și cantitatea antistreptolizinei O în serul bolnavului. Cercetările întreprinse în țara noastră de Baldoșin și colaboratorii au arătat că titrurile normale de antistreptolizina O ating valori până la 200 unități pe ml ser. Titrurile crescute indică existența unei recente afecțiuni streptococice grupa A, dar și purtători amigdalieni de streptococi hemolitici. A doua reacție este titrarea antistreptokinazei - ASK - și se practică atunci când ASLO este neconcludentă. Un titru peste 1/160 se consideră pozitiv.

- **Diagnosticul biologic.** Acest diagnostic se face cu:

Reacția Dick. Este o intradermoreacție în care antigenul este reprezentat de toxină de streptococi hemolitici izolați de la bolnavii de scarlatină, diluată, astfel încât

0,2 ml să conțină o unitate cutanată. Se inoculează pe fața anterioară a antebrațului drept 0,2 ml toxină activă, iar ca martor, la celălalt antebraț, aceeași cantitate de toxină inactivă 3 h la 100°C. Citirea se face la 24 h.

Fenomenul de stingere Schultze-Charlton. Această probă este extrem de utilă, ea permițând să se deosebească erupția scarlatină de una scarlatiniformă, erupții înălnite în unele intoxicații. Se practică inoculând intradermic 0,2 ml ser de convalescent de scarlatină sau ser antiscarlatinos diluat 1/10, în plină zonă de erupție. Dacă erupția este scarlatină, după 6-12 h se observă o plărie a zonei în jurul inoculării, aceasta pentru că toxina scarlatină este neutralizată de antitoxina din serul scarlatinos și, în consecință, tegumentele capătă aspectul normal.

Epidemiologie. Epidemiologia infecțiilor cu streptococi vizază în primul rând scarlatina și angina streptococică, boli frecvent înălnite în regiunile temperate ale globului, unde afectează în special copiii. Cu toate că ambele afecțiuni sunt înălnite în număr redus în tot timpul anului, frecvența mare este în sezonul rece, când se creează condiții favorizante, și mai ales în colectivități.

Sursa de infecție este reprezentată de:

- bolnavii de scarlatină tipică, ce sunt infecțioși încă din perioada de incubatie. Nu trebuie neglijați convalescenții cu complicații: rinite, otite, adenite supurate, care prin numărul mare de streptococi, eliminați aproape în cultură pură, reprezintă importante surse de infecție;

- bolnavii cu amigdalite și faringite streptococice al căror număr în mediul epidemic este foarte mare și care scapă adesea celor cărora le revine aplicarea măsurilor de profilaxie;

- purtătorii sănătoși, cei cu infecții inaparente, al căror procent variază între 5 și 20%.

Epidemiile de scarlatină apar în valuri, la intervale cam de 7 ani, interval explicat de creșterea în această perioadă a numărului de copii receptivi.

Întrebară firească care se pune este: de ce unii indivizi fac scarlatină, alții numai amigdalite-faringite, iar a treia categorie, a purtătorilor sănătoși, nici o manifestare morbidă?

Explicația este următoarea: se știe că există o imunitate antimicrobiană și una antitoxică. Indivizii care au o imunitate antimicrobiană, indiferent dacă este însoțită sau nu de cea antitoxică, atunci când vin în contact cu un streptococ hemolitic sau îl elimină imediat, sau acesta rămâne în rinofaringe pentru o perioadă oarecare, fără să provoace nici o modificare a organismului. Este cazul purtătorului sănatos. La individul care nu prezintă imunitate antimicrobiană streptococul va provoca, la cel cu reacție Dick pozitivă, deci sensibil la toxina streptococică, scarlatină cu toate manifestările ei: febră, eritem caracteristic și fenomene toxice de diferite intensități, iar la cei cu reacție Dick negativă (indicator al imunității antitoxice), numai amigdalită-faringită.

Întrucât sunt unii cercetători care socotesc că nu streptococul este singurul

responsabil de producerea scarlatinei, el fiind socotit numai un germene de acompaniament, se vor cîta cîteva observații în sprijinul etiologiei streptococice:

- aproape la 100% din cazurile de scarlatină s-a pus în evidență streptococul hemolitic;
- s-a putut provoca scarlatină persoanelor Dick pozitive, prin badjionarea faringelui cu streptococi izolați de la scarlatinosi;
- se poate obține imunizarea contra scarlatinei prin injectarea de anatoxină streptococică;
- antitoxina streptococică, introdusă intradermic, face să dispară erupția scarlatinoasă.

3. PNEUMOCOCCUL (STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE)

Pneumococul este considerat în prezent o specie a genului Streptococcus, cu semnificație patogenică pentru om.

Habitat. Pneumococul populează evasiconstant căile respiratorii superioare ale omului și ale animalelor, pentru care germeul are un tropism deosebit. El face parte din flora saprofită normală a mucoasei tractusului respirator superior, 20% până la 70% dintre persoanele normale putînd fi purtători nazofaringieni temporari sau permanenți de pneumococ. În anumite condiții prielnice el își poate exalta virulența, devenind patogen și fiind capabil să provoace infecții acute și, mai rar, cronice, ale mucoaselor respiratorii și ale seroaselor aferente la om. Animalele purtătoare de pneumococ sunt: cîinii, pisicile, caii, vîștii, cobaii, șobolanii și maimuțele.

Caractere morfologice și tinctoriale. În produsele patologice și în culturile proaspăt izolate din infecții, pneumococii au o formă caracteristică de coci ovalari, lanceolați (în formă de flacără de lumînare), de 0,5-1,25 μ diametru și sunt dispuși caracteristic în diplo- sau în lanțuri scurte, privindu-se prin capetele mai bombate. Sunt Gram-pozitivi, nesporulați, iar variantele virulente posedă capsulă. Formele "R" (rough) de pneumococi sunt degradate, nu posedă capsulă, sunt avirulente, frecvent înfăluite pe mucoasele respiratorii și, uneori, pierd proprietatea de a reține violetul de gentiană, apărînd colorați în roșu-violet. Capsula nu se colorează prin colorațiile obișnuite și se prezintă ca un halou alb refringent în jurul cociilor colorați. În culturile de laborator, forma pneumococilor este mai puțin tipică, de coci mai rotunjiți, cu tendința de a se așeza în lanțuri (relativ scurte), iar capsula mai puțin evidentă.

Caractere de cultură. Pe medii simple, pneumococii se dezvoltă foarte greu sau deloc. Dat fiind că au cerințe nutritive complexe cultivarea se obține pe medii bogate care conțin anumiți aminoacizi, factori de creștere și glucoză ca sursă principală de energie. Pneumococii cresc bine pe medii îmbogățite cu sînge de cal (sau de berbec), cu ser sau cu lichid de ascită. Temperatura optimă de dezvoltare este de 37°C, iar pH-ul optim al mediilor 7,6-7,8. În medii lichide de tipul bulionului TIEB glucozat 2% sau al bulionului I.C. (preparat de Institutul Cantacuzino) glucozat 2%, pneumococii cresc abundent și tulbură uniform mediul cu formare de depozit. Trebuie menționat însă că,

în medii lichide, pneumococii încep să se autolizeze rapid după primele 7-8 h de incubare, datorită formării peroxidului de hidrogen (H_2O_2). Sângele avîntajează conservarea culturilor prin cataliza din hematii care descompune H_2O_2 . Prezența CO_2 favorizează creșterea, de aceea, pentru izolarea germeului din produse patologice, se recomandă incubarea mediilor în paralel, în aerobioză și în exicator cu atmosferă de aproximativ 5-10% CO_2 (procedul lumînării).

Deoarece păstrarea tulpinilor de colecție este foarte dificilă, liofilizarea rămîne practic, metoda optimă care conservă intacte viabilitatea și proprietățile biologice ale pneumococilor pe o durată lungă (1-2 ani). Pe geloză-sînge 4-6%, pneumococii capsulați cresc bine, producînd colonii de tip "S" (smooth), mici de aprox. 1-5 mm diametru, plate, transparente, cu aspect de picătură de rouă, înconjurate de un halou verzui (α -hemoliză), ca și coloniile de Streptococcus viridans, de care se diferențiază net prin faptul că numai pneumococul capsulat produce septemie mortală la șoarec. Pe geloză-sînge, la adăpost de lumină, pneumococii rămîn viabili aproximativ 3-4 zile.

Caractere biochimice și de metabolism. Pneumococii sunt microbi aerobi, facultativ anaerobi. Elaborează diferite enzime zaharolitice, proteolitice și lipolitice. Glucoza este fermentată cu producere de acid lactic pe cale anaerobă. Nu posedă citocrom, catalază sau peroxidază. Pneumococii mai fermentază numeroase alte zaharuri, dintre care inulina este descompusă caracteristic. Autoliza pneumococilor este cauzată de enzimele proteolitice și lipolitice, de producerea de H_2O_2 , acidifierea mediilor în urma fermentării zaharurilor și de creșterea potențialului de oxidoreducere a mediilor de cultură. Bila sau sărurile biliare determină clarificarea culturilor de pneumococi în mediul lichid (biloliza descrisă de Neufeld). Biloliza este caracteristică pneumococilor și îi diferențiază net de Streptococcus viridans. Pneumococii, ca și streptococii viridans, elaborează o enzimă cu acțiune hemolitică de tip α (viridans).

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Pneumococii sunt puțin rezistenți la acțiunea luminii, a uscăciunii și a frigului. Germenii mor în 10 min la 52°C. Sunt foarte sensibili la toate antisepticele. Optochinul este bactericid în concentrație de 1/500.000. Pneumococii sunt sensibili la acțiunea sulfamidelor, a penicilinei și a majorității antibioticelor cu spectru larg de acțiune.

Structura antigenică. Dintre numeroasele antigene descrise la pneumococi, polizaharidul capsular sau substanța solubilă specifică (SSS) este cel mai important antigen, care conferă specificitatea serologică și virulența pneumococilor. În baza acestor antigene capsulare au fost descrise inițial tipurile clasice de pneumococ I, II și III și grupul IV heterogen, iar astăzi numărul serotipurilor a ajuns la peste 80. Cu ajutorul serurilor antipneumococice specifice de tip, germeni sunt identificați prin reacții de aglutinare și mai ales prin reacția de umflare a capsulei (fenomenul Neufeld).

Caractere de patogenitate. Pneumococii sunt bacterii tipice virulente prin prezența capsulei care inhibă fagocitoza; germeni mai elaborează enzime (hialuronidază) care le asigură invazivitatea dar nu produc toxine propriu-zise. În mod

obișnuit, pneumococul se comportă ca un microorganism condiționat patogen și devine patogen numai în anumite condiții favorizante, morbiditatea prin infecții pneumococice fiind mai mare la copii și bătrâni. Pneumococii participă frecvent ca bacterii asociate în infecții respiratorii mixte acute și cronice, ca: traheobronșite cronice, bronhopneumonii, abcesele pulmonare. Infecțiile pneumococice apar, de obicei, după afecțiuni care scad rezistența normală a mucoaselor căilor respiratorii, după boli anergizante, ca: virozele respiratorii, gripa, rujeola, tuberculoza etc. Pneumococul este principalul agent etiologic al pneumoniei acute care afectează, mai ales, adulții. El mai poate produce bronhopneumoni, otite, mastoidite, sinuzite, pleurizii, meningite etc., în special la copii.

Dintre animalele de laborator, șoarecele alb este deosebit de sensibil la infecția pneumococică. Injectat pe cale subcutanată în regiunea dorsală spre baza cozii cu produsele patologice, animalul face în 1-3 zile o septicemie mortală cu diplococi Gram-pozitivi capsulați, prezenți pe frotiurile din sânge și din organe (splină, ficat), fapt care servește ca test biologic în diagnosticul de laborator.

Imunitatea. În pneumococi, fie dobândită prin boală, fie prin starea de purtător rinofaringian, fie prin vaccinare este numai specifică de tip și se datorește anticorpilor anti-SSS; imunitatea se traduce prin prezența în sânge a precipitinelor, a aglutininelor specifice care favorizează fagocitoza germinilor.

Tratamentul. Pneumococii sunt sensibili la majoritatea sulfamidelor și a antibioticelor. Înainte de era antibioticelor, în infecțiile pneumococice se aplica tratamentul cu ser antipneumococic. Ulterior, tratamentul s-a făcut cu sulfamide și ser specific, apoi cu antibiotice, mai ales cu penicilină. Astăzi, la nevoie, în cazurile grave, când apar rezistențe la sulfamide și antibiotice, se recurge la asociații de antibiotice, la seroterapie și vaccinoterapie.

Infecțiile pneumococice nu ridică probleme de ordin epidemiologic. Transmiterea germinilor se face pe cale aerogenă (tuse, strănut etc.). La copiii mici din colectivitățile închise (creșe, casa copilului etc.) se poate recomanda aplicarea preventivă în lunile septembrie-octombrie a unor vaccinuri polivalente antipneumococice.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul etiologic al infecțiilor pneumococice este bacteriologic și constă din:

- recoltarea produselor patologice;
- examenul direct microscopic și microscopic din produsul patologic;
- izolarea gemenului prin înșămânțări pe medii adecvate și inoculare la șoarece;
- identificarea pneumococului prin reacții biochimice și serologice;
- antibiograma.

Produsele patologice cercetate pentru prezența pneumococului ca agent cauzal sunt multiple:

- Secreții nazofaringiene în angine, amigdalite, recoltate pe tamponane nazofaringiene sterile.
- Secreții mucopurulente (ușor verzui, cu consistență cremoasă, fibrinoasă) în sinuzite și otite, mastoidite, recoltate pe tamponane sau, după caz, prin puncție sterilă.

- Expectorație mucopurulentă în traheobronșită, bronșită acută și cronică, bronhopneumonie, abces pulmonar și sputa ruginie caracteristică din pneumonia francă lobară (conține particule purulente verzui, mucus, hematii și leucocite).
- Exsudatul pleural purulent (cremos, fibrinos, cu reflexe verzui din pleurezia pneumococică).

- Lichidul cefalorahidian purulent (cremos, fibrinos) din meningita și meningocelafalia pneumococică.

- Exsudatul purulent peritoneal din peritonita pneumococică.
- Exsudatul purulent pericardic din pericardita pneumococică.

- Sângele (hemocultura) în stările septicemice și în endocardia acută vegetantă.

- Lichidul purulent (ușor verzui, cremos, fibrinos) din artrita acută pneumococică.

Din produsele patologice proaspăt recoltate se fac frotiuri, se colorează prin metoda Gram și cu albastru de metilen. Se pun, astfel, în evidență diplococi Gram-pozitivi, lanceolați, capsulați. Concomitent, produsele sunt înșămânțate pe geloză-sânge și sunt inoculate la șoarece. Când pneumococii sunt în cultură pură (lichid cefalorahidian, secreții purulente pleurale, peritoneale, articulare, pericardice) se poate face reacția de umflare a capsulei direct în produs.

După înșămânțare prin dispersie, plăcile cu geloză-sânge (cal, herbec) sunt incubate 24 h, la 37°C. Pneumococii cresc sub forma unor coloni ca picături de rouă, cu o zonă de hemoliză verzuie în jur. Aceste colonii sunt repicate în bulion I.C. glucoză 2% și incubate maximum 16 h, la 37°C, după care urmează identificarea tulpinii: frotiu colorat Gram, testul biolizei, fermentarea inulinei, sensibilitatea la optochin, reacția de umflare a capsulei, eventual aglutinarea în tub cu ser specific de tip și determinarea sensibilității la sulfamide și antibiotice pe plăci cu geloză-sânge după metoda obișnuită difuzimetrică cu comprimate standardizate.

Metoda cea mai rapidă și sigură de izolare și confirmare a patogenității pneumococului este *inocularea la șoarece*. Produsele suprainfectate (exsudat faringian, secreții otice, spută etc.) sunt inoculate la șoarece pe cale subcutanată (0,5 ml din produsul suspensionat în ser fiziologic). Produsele în care pneumococii sunt în cultură pură (L.C.R., sânge, exsudat pleural, peritoneal, articular, pericardic) pot fi inoculate intraperitoneal. După 1-3 zile se declanșează o septicemie mortală. Șoarecii morți sunt autopsiați. Se fac hemoculturi în bulion I.C. glucoză 2% și, după o incubare de 14 h, se face reacția de umflare a capsulei și frotiuri ce se colorează Gram și cu albastru de metilen. Se fac amprente din ficat și splină care sunt colorate Gram și cu albastru de metilen Löffler pentru punerea în evidență a capsulei.

Colorarea amprentelor de organ se face prin acoperirea lamelor cu albastru de metilen alcalin Löffler și, după 10 min, spălare și examinare cu imersie. Soluția de albastru de metilen Löffler se prepară din: soluție alcoolică 10g% de albastru de metilen 30 ml, apă distilată 100 ml, soluție apoasă 1% de KOH 1 ml.

Epidemiologie. Pneumoniile bacteriene sunt produse, în proporție de aproximativ 4/5, de către pneumococ. În cursul vieții, peste jumătate din populația umană este la un moment dat purtătoare de pneumococi virulenți. Transmiterea germinilor se face

pe cale respiratorie. Boala este endemică și ea se declanșează când rezistența naturală a individului scade și apar condiții favorizante pentru dezvoltarea pneumococului. Factorii favorizanți sunt constituiți de bolile infecțioase provocate de alți agenți patogeni, în special de virusuri, inhalarea unor gaze iritante care lezează mucoasa respiratorie, intoxicația alcoolică care diminuează fagocitoza și reflexul de tuse, congestia pulmonară de stază în bolile cardiace, malnutriția și debilitatea generală. Populația receptivă poate fi protejată prin imunizare cu un vaccin preparat din polizaharidele specifice, dar valoarea practică a vaccinării este redusă. Prevenirea bolii se poate face mai degrabă prin combaterea și evitarea factorilor predispozanți, mai ales pentru copii și bătrâni.

Cap. XIV. COCII GRAM-NEGATIVI (GENUL NEISSERIA)

Meningococul și gonococul sunt cele două specii de *Neisseria* strict patogene pentru om. În afara acestora, unele specii de *Neisseria* considerate saprofite pot produce ocazional la om infecții cu caracter sporadic.

1. MENINGOCOCCUL (*NEISSERIA MENINGITIDIS*)

Meningococul este una din speciile patogene pentru om ale genului *Neisseria*. Principala boală produsă de meningococ este meningita cerebrospinală meningococică (MCSM).

Habitat. Germenul nu este întâlnit în natură în stare liberă. El se găsește numai la omul bolnav și în secrețiile nazofaringiene ale persoanelor purtătoare de meningococ.

Caracterele morfologice și tinctoriale. Meningococi sunt coci Gram-negativi, cu diametrul de 0,6-1 μ , sferici, ovalari, imobili, nesporulați care, în special în produsele patologice, se prezintă sub forma caracteristică de diplococi cu aspect de boabe de cafea care se privesc prin fețele lor tutute.

Caractere de cultură. Meningococi se autolizează rapid atât în produsele patologice, cât și în culturile de laborator. Meningococul nu crește pe medii nutritive simple (bulion, geloză); pentru a se dezvolta are nevoie de lichide organice cu conținut bogat în proteine native, ca: sângele, serul, lichidul de ascită. În medii lichide îmbogățite crește puțin. Pe geloză-sânge, geloză-ascită, geloză-ser produce, după 20-24 h de incubare la 37°C, colonii de tip "S" (smooth) rotunde, convexe, mici (diametrul de aproximativ 1 mm), cu margini regulate, care după 48 h ajung la 2-3 mm în diametru. Germenul crește foarte bine pe mediul Müller-Hinton gelozat, care conține infuzie dublu concentrată de inimă de vită și aminoacizi extrași din cazena prin hidroliză acidă. De la purtătorii sănătoși de meningococ se izolează și colonii de tip "R" (rough). Culturile de laborator sunt păstrate pe mediul Mueller-Hinton, drept, sub strat protector de 1-2 ml ulei de parafină steril și numai la 37°C, trebuind să fie subcultivate la 30-40 de zile. Liofilizarea este metoda cea mai bună de conservare a meningococilor.

Caractere biochimice și de metabolism. *Neisseria meningitidis* este un germene aerob, facultativ anaerob, care nu se cultivă decât la o temperatură optimă (35-38°C) și la un pH optim (7,2-7,4). Fermentează caracteristic glucoza și maltoza și nu fermentează levuloza, zaharoza și lactoza; produce catalază și conține o citocromoxidază care stă la baza reacției oxidazei, prin care se diferențiază speciile genului *neisseria* de alte microorganisme care nu posedă această enzimă. Prin reacțiile biochimice produse în cursul metabolismului, meningococii alcalinizează mediile de cultură; de aceea, se recomandă cultivarea în atmosferă de CO₂, care favorizează creșterea și combate alcalinizarea.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Meningococii sunt germeni

extrem de sensibili la variații de temperatură și de pH. Lumina solară, frigul și uscăciunea îi omorâ rapid. Culturile lăsate la temperatura laboratorului mor repede, în mare măsură datorită antilinelor secretate de germeni. Sunt foarte sensibili la acțiunea antisepticilor, subliniatul 1% omorându-i instantaneu; de asemenea, sunt sensibili la acțiunea sulfonamidelor și antibioticilor, penicilina fiind antibioticul de elecție în tratamentul infecțiilor meningococice.

Structura antigenică. Numeroasele studii imunochimice și imunobiologice ale substanțelor antigenice extrase din meningococi au dus la stabilirea clasificării internaționale actuale a meningococilor, care cuprinde următoarele tipuri serologice: A, B, C, D, X, Y, Z. Substanța specifică de tip este de natură polizaharidică. Meningococii de tip A, C și Y au o structură antigenică omogenă, iar serotipul A posedă proprietăți imunizante mai marcante, în timp ce meningococii de tip B sunt heterogeni și mai slab imunogeni.

Caractere de patogenitate. La purtătorii sănătoși de meningococ, germele populază mucoasa rinofaringiană, fără a produce leziuni locale sau complicații. Dintre infecțiile cauzate de meningococ, meningita cerebrospinală epidemică (MCSE) este boala cea mai importantă. În conceptul epidemiologic actual, MCSE este considerată ca o complicație accidentală a meningococilor în general; acestea sunt boli infecțioase strict umane, transmise pe cale respiratorie, a căror expresie clinică obișnuită este rinofaringita, care precede, obligatoriu, localizarea meningee.

Infecția meningococică se poate disemina pe cale limfatică sau sanguină, producând meningita sau alte localizări la distanță pe seroase (articulare, pleurale, endocardice, pericardice), conștând din reacții congestive serofibrinoase sau purulente. La nivelul tegumentelor, meningococii pot produce erupții eritematoase, petesiale (hemoragice) sau pustuloase. Patogenitatea pare să fie legată de tipul serologic de meningococ. Serotipul A se izolează în timpul epidemiei majore de MCSE; s-a demonstrat că serotipurile A și C pot forma capsulă, devenind astfel mai virulente. Meningococii de tip B nu formează capsulă și sunt izolați mai mult în perioadele interepidemice. Tipul D este foarte rar întâlnit, iar tipurile X, Y și Z sunt izolate mai mult de la cazuri sporadice de infecții meningococice. În afară de virulență, patogenitatea meningococilor se manifestă și prin introducerea de endotoxină; șoarecele inoculat intraperitoneal cu tulpini recent izolate de meningococ moare prin intoxicație cu endotoxină.

Imunitatea antimeningococică este de tip umoral și se datorește anticorpilor serici induși de infecții meningococice sau de simpla stare de portaj (bacteriolizine, opsonine, aglutinine, precipitine, anticorpi fixatori de complement). Rezistența la infecțiile meningococice pare a fi specifică de tip; ea poate fi obținută cu ajutorul unor vaccinuri antimeningococice eficiente care conțin polizaharidul specific.

Tratamentul infecțiilor meningococice se face prin administrare de antibiotice (de obicei, penicilină) și sulfamide, iar în cazurile grave se asociază seroterapia cu ser terapeutic antimeningococic polivalent preparat de cal. În meningococemiile grave,

serul este injectat intramuscular și chiar intravenos. În MCSE, serul se administrează intrarahnidian.

Diagnosticul de laborator. Se adresează bolnavilor cu infecții meningococice, produselor de la cadavru (sânge, organe, exsudate seroase) și purtători nazofaringieni. Diagnosticul de laborator constă din:

- 1) recoltarea produselor patologice;
- 2) examenul direct macroscopic și microscopic al produselor patologice;
- 3) însămânțări pe medii adecvate pentru izolarea agentului patogen;
- 4) identificarea serologică și biochimică a tulpinii izolate;
- 5) testarea sensibilității la sulfamide și antibiotice.

Recoltarea. În MCSE se prelevă, prin puncție lombară aseptică, lichid cefalorahnidian (L.C.R.) în două eprubete sterile, pe cât posibil mai aproape de debutul bolii și înaintea începerii tratamentului. De la bolnav se mai recoltează în prima săptămână de boală aproximativ 8-10 ml sânge, prin puncție venoasă aseptică, și se însămânțează pe loc într-un balon cu bulion glucozat 2% îmbogățit cu ser steril de bou sau cal ori cu lichid de ascită 25%; mediul este, în prealabil, încălzit la 37°C. De la bolnavii cu MCSE se mai recoltează peampoane de vată sterilizate la autoclav secrețiile nazofaringiene de pe amigdale și vălul palatin înapoia luelei, având grijă să evităm înnuierarea în salivă.

Recoltarea se face dimineața pe nemâncate sau la 4-5 h de la ultima masă, fără badijonaie locale sau gargară de orice fel și înaintea administrării de antibiotice. De la bolnavii cu septicemie și erupții petesiale, în afară de sângele pentru hemocultură, se mai recoltează cu o seringă sterilă, prevăzută cu un ac fin sau cu o pipetă Pasteur fin efiliată, lichidul hemoragic din leziunile cutanate, pensând pielea în jurul leziunii. De la cadavru se prelevă aseptice, în primele 6-8 h de la deces, L.C.R., din ventriculii laterali și de la baza creierului, puroi de pe meninge și de la nivelul coamelor medulare posterioare, eventual fragmente de organe (splină, ficat, cord, exsudate seroase articulare, pleurale, peritoneale, sânge recolat prin puncție cardiacă). De la purtătorii de meningococ se recoltează secrețiile nazofaringiene, în aceleași condiții ca la bolnavii cu MCSE.

Examenul microscopic din produsele patologice. În MCSE, L.C.R. poate fi tulbure, opalescent sau limpede. Lichidul cefalorahnidian din una dintre eprubete va servi la însămânțări și la efectuarea a trei frotiuri, la fel și sedimentul L.C.R. (din a doua eprubetă) centrifugat în condiții de sterilitate 10 min la 1000 turații/min. Fixarea lamelor se face prin trecerea rapidă prin flacără sau preferabil cu alcool metilic timp de 5 min. Frotiurile sunt colorate prin metoda Gram, Giemsa și cu albastru de metilen. În cazurile pozitive tipice (L.C.R. purulent), pe frotiul Gram se observă numeroase polimorfonucleare și diplococi tipici (boabe de cafea) Gram-negativi intra- și extracelulari. Frotiul colorat Giemsa servește la diferențierea meningitelor bacteriene de cele virale, în care se observă o reacție leucocitară abacteriană cu limfomonocitoză. În supernatantul clar de L.C.R. centrifugat se testează prezența antigenului specific antimeningococic (relația inelului de precipitare) și se dozează albumina și globuline.

Din celelalte produse de la bolnav (exsudate articulare, pleurale, peritoneale, lichid peteșial-hemoragic), ca și din probele de la cadavru, se efectuează, de asemenea, examenul microscopic pe frotiuri colorate Gram, Giemsa și cu albastru de metilen.

Însămânțarea și izolarea. Produsele patologice recoltate la distanță folosite pentru însămânțări în vederea izolării germeniului cauzal vor fi transportate imediat la laborator, în cutii izotermice (la 37°C). Se recomandă ca atât frotiurile, cât și însămânțările să se facă pe loc, la patul bolnavului, deoarece meningococii, fiind ușor autolizabili, dispar rapid prin păstrarea mai îndelungată a produselor. Se fac însămânțări simultane pe: mediul Mueller-Hinton înclinat (M-H) sau pe tuburi cu geloză-ser, geloză-ascită 25%, pe geloză înclinată, geloză-șocolat și pe o plăcă de geloză-sânge (G-S), toate încălzite la 37°C. Însămânțarea pe geloză diferențiază meningococii de neisseriile saprofite (Neisseria catarrhalis, N. perflava, N. flava și N. subflava etc.) care pot fi, uneori, implicate în etiologia meningitelor. Spre deosebire de meningococ, neisseriile saprofite cresc și pe geloză simplă, chiar și la temperatura de menținere. Pe geloză-șocolat cresc și meningococii și sușele de Haemophilus laboratorului. Pe geloză-șocolat cresc și meningococii, iar pe G-S se dezvoltă marea majoritate a influențelor (care pot produce meningite), iar pe G-S se dezvoltă marea majoritate a germeniilor, inclusiv cei pretențioși, care pun probleme de diagnostic diferențial etiologic în meningitele bacteriene. Sedimentul de L.C.R. centrifugat steril, lichidul hemoragic din erupția peteșială, ca și produsele de la cadavru sunt însămânțate pe același mediu, 3 zile consecutiv. Izolarea meningococului de la purtători se face prin însămânțarea și dispersia secrețiilor nazofaringiene pe plăci cu mediul selectiv LCN (lincomicină, colimicină și nistatină) care sunt incubate la 37°C, obligatoriu în atmosferă de CO₂ (excicator cu lămpă aprinsă). Toate mediile însămânțate sunt incubate la 37°C și a doua zi se fac citirile urmărindu-se apariția culturii de meningococ (colonii mici, cu diametrul de aproximativ 1 mm, rotunde, translucide).

Identificarea culturii izolate. Din culturile suspecte se fac frotiuri care se colorează Gram. Neisseriile apar la microscop ca diplococi Gram-negativi caracteristici. Se efectuează, de asemenea, aglutinări pe lamă cu ser polivalent antimeningococic și cu seruri specifice de tip, și însămânțări în medii zaharate speciale (M-H cu roșu-fenol sau mediu Hiss cu ser de bou și albastru de brom-timol). Meningococul aglutinează în contact cu serul polivalent și cu serul anti, specific tipului cărui îi aparține tulpina respectivă. Tulpinile de meningococ, atât cele aglutinabile, cât și cele atipice neaglutinabile, fermentază specific glucoza și maltoza și nu fermentază levuloza, zaharoza și lactoza. Prin reacțiile de fermentare a zaharurilor se face diagnosticul diferențial al speciilor din genul Neisseria (N. meningitidis, neisserii saprofite etc.). Confirmarea apartenenței tulpinii izolate la genul Neisseria se face prin reacția oxidazei: se acoperă cultura cu 1-2 picături dintr-o soluție preparată extemporaneu, aproximativ 1% reactiv (dimetil-dietil- sau tetrametil parafenilendiamoniu diclorid) în apă distilată. Reacția este pozitivă când cultura se colorează la început în roz, care virează rapid în roșu-ciclam intens, apoi în cafeniu,

iar după 15-20 min apare colorată în negru; cultura nu este viabilă decât în primele două stadii.

La cazurile de meningită cu bacterioscopie și culturi negative se încearcă stabilirea unui diagnostic etiologic de MCSM printr-o reacție de precipitare. În tuburi subțiri se pun în contact, fără a le amesteca, cantități aproximativ egale de supernatant clar de L.C.R. centrifugat și seruri antimeningococice (polivalent sau seruri monovalente specifice de tip). În cazurile pozitive, după 2-3 min apare un inel alb-lăptos de precipitare la limita de separație dintre L.C.R. și ser.

Testarea sensibilității la sulfonamide și antibiotice. În infecțiile meningococice care nu răspund bine la tratament și, de asemenea, când trebuie făcută sterilizarea purtătorilor pentru stingerea focarelor epidemice, antibiograma este necesară, deoarece aduce indicații prețioase pentru alegerea corectă a antibioticelor și chimioterapicelor folosite în aceste scopuri. Antibiograma se efectuează prin metoda clasică difuzimetrică, pe plăci cu mediu M-H, folosind microcomprimat standardizate de sulfonamide și antibiotice. Incubarea plăcilor la 37°C se face numai în atmosferă de CO₂.

Epidemiologie. Meningita meningococică survine în valuri epidemice. Între aceste valuri epidemice apar cazuri sporadice. Boala se transmite pe cale aeriană.

Infecțiile meningococice apar mai ales în colectivități închise: ambarcații maritime, internate, școli, case de copii. Rezervorul de infecție îl reprezintă purtătorii nazofaringieni de meningococ, iar factorul aglomerare favorizează transmiterea și exacerbarea virulenței agentului patogen pe circuitul receptorilor, fiind afectate cu precădere anumite grupe de vârstă: copii mici între 0 și 5 ani, adolescenții și bătrânii. Sezonul rece, obosala fizică, virulența intrinsecă a microbului invadator, capacitatea imunogenă slabă a gazdei infectate, precum și o situație economică și igienico-sanitară precară sunt factori favorizanți pentru apariția imbolnăvirilor.

Epidemiile pot fi prevenite prin imunizări în masă cu un vaccin polizaharidic specific, prin sterilizarea purtătorilor cu sulfamide sau antibiotice, precum și prin combaterea și evitarea factorilor favorizanți, în primul rând aglomerațiile.

2. GONOCOCCUL (NEISSERIA GONORRHOEAE)

Neisseria gonorrhoeae sau gonococul este agentul patogen al gonoreei sau al blenoragiei, cea de-a doua boală venetică majoră, după sifilis. Este o specie microbiană strict patogenă pentru om, care atacă cu predilecție mucoasele genitourinare.

Habitat. Gonococul parazitează omul, fiind găsit pe mucoasa uretrală, endocervicală, vaginală, rectală, iar la bolnavii cronici insuficient tratați, germeni se cantonează în glandele anexe ale aparatului urogenital, unde pot persista timp îndelungat.

Caractere morfologice și tinctoriale. Sunt coci Gram-negativi, cu diametrul de

0,6-1 μ , reniformi, nesportați, așezați câte doi (diplococi), semănând cu două boabe de cafea ce se privesc prin fețele lor turtite.

Pot prezenta o microcapsulă în culturile tinere, proaspăt izolate. În exsudatele (puroi) din supurațiile acute, morfologia microscopică este tipică, de diplococi Gram-negativi extracelulari și intracelulari-fagocitați de leucocitele polimorfonucleare.

Caractere de cultură. Gonococul este un germene aerob, facultativ anaerob, foarte "exigent" care nu se cultivă pe medii simple. Pentru dezvoltare necesită medii îmbogățite cu ser, plasmă, lichid de ascită, sânge defibrinat, hemoglobină sau extract globular, glucoză, autolizat de drojdie de bere. Izolarea din produsele patologice și cultivarea gonococului nu se pot obține decât prin incubare în aerobioză cu o atmosferă de 5-10% CO_2 ; creșterea optimă are loc la pH 7,4 și la temperatura de 36-37°C. Colonile de gonococ în culturile de 24 h proaspăt izolate sunt de tip "smooth", în general mici, cu diametrul de 1 mm, rotunde, netede, ușor convexe, translucide sau chiar transparente, având o consistență ușor mucoasă.

Caractere biochimice și de metabolism. Gonococul elaborează enzime autolitice care scad mult viabilitatea culturilor. El fermentază glucoza, dar nu fermentază alte zaharuri și sintetizează citocromoxidaza, aceste reacții fiind folosite ca teste de diagnostic. Testarea fermentării unor zaharuri constituie principala probă biochimică ce permite diferențierea gonococului de meningococ sau de alte neisserii.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. La temperatura ambiantă, gonococii sunt puțin rezistenți la uscăciune și lumină; nu supraviețuiesc decât 2-3 ore, atât în secreții cât și în cultură. Nu rezistă la +4°C, de aceea culturile sunt păstrate viu circa 30-40 de zile la temostat sub strat protector de ulei de parafină care împiedică acidifierea. Căldura și antisepticele îi omorâă rapid. Gonococii sunt, în general, sensibili la penicilină și antibioticele cu spectru larg. În etapa actuală au redevenit sensibili la sulfonamide. Trebuie menționat că, în funcție de tulpinile circulante, se constată astăzi grade variate de sensibilitate la penicilină și rezistență la unele antibiotice (streptomycină, kanamicină), ceea ce impune folosirea unor doze terapeutice de penicilină de zeci de ori mai mari decât la începuturile erei antibioticelor.

Structura antigenică. Folosirea tehnicilor cu anticorpi fluorescenți a permis evidențierea unui antigen solubil, capsular K, de natură polizaharidică, specific de specie, prezent la culturile tinere, virulente, de gonococ. Antigenul K este stabil la formol și la temperatura de 100°C și stă la baza preparării antigenelor preconizate în serodiagnosticul gonoreei cronice în vederea decelării anticorpiilor serici specifici prin reacții de microfloculare, hemaglutinare pasivă sau fixare de complement. A fost pusă în evidență și o endotoxină de natură lipopolizaharidică, "gonotoxină", care produce starea de sensibilizare alergică constantă în infecțiile cronice și care se pare că ar avea rol în invazia celulară.

Caractere de patogenitate. Patogenitatea gonococului se manifestă prin

virulență, care ține de prezența antigenului capsular. La bărbat, gonoreea, se manifestă, la început, ca o uretrită acută anterioară cu eliminare de puroi prin uretră și, netratată, infecția se extinde la uretra posterioară și, apoi, la organele anexe ale tractusului urogenital. La femeie se produce, mai întâi, inflamația colului uterin (endocervicita), însoțită de eliminarea unei secreții mucopurulente prin vagin, iar apoi infecția se poate extinde din aproape în aproape, producând inflamația mucoasei uterine (endometrita), a trompelor (salpingita) și a mucoasei rectale (rectita). Foarte frecvent, infecția gonococică la femeie se cronicează, datorită netratării sau unui tratament insuficient.

Ocazional, microbul poate infecta mucoasa conjunctivală a nou-născutului, generând oftalmia gonococică și poate provoca vulvovaginita acută gonococică la fete. Mai rar, gonococul produce infecții generalizate pe cale sanguină cu diseminări pe seroase, generând artrită, endocardită, meningită. Mai frecvente sunt complicațiile locale ale aparatului urogenital: cistita și pielita, orhiepидidita și prostatita la bărbat, endometrita și salpingita la femeie.

Recent, a fost reprodusă experimental pe cimpanzeu o uretrită acută gonococică identică cu cea de la bărbat și astfel s-au deschis perspective noi de cercetare, pentru evaluarea testelor de serodiagnostic, pentru elaborarea unor vaccini antigonococice eficace și pentru testarea "in vivo" a sensibilității gonococilor la sulfonamide și antibiotice.

Imunitatea. Infecția gonococică evoluează de cele mai multe ori, ca o afecțiune locală; ea nu produce o stare de rezistență specifică, reinfecțiile fiind posibile.

Tratamentul. Se face prin administrarea de antibiotice și sulfonamide în doze adecvate și trebuie să fie individualizat în funcție de antibiogramă. Vaccinul antigonococic are o acțiune desensibilizantă și se recomandă în formele cronice.

Diagnosticul de laborator. În infecțiile gonococice, diagnosticul constă din: recoltarea produselor patologice; recunoașterea morfologiei microscopice a gonococului pe frotiuri din produsul patologic (posibilă, mai ales, în infecțiile acute); înșămânțarea produselor pe medii adecvate de izolare; identificarea biochimică prin reacția oxidazei și înșămânțare pe medii zaharate (fermentarea exclusivă a glucozei) și stabilirea sensibilității la chimioterapie și antibiotice (antibiograma).

Recoltarea produselor patologice. Secrețiile mucopurulente uretrale, endocervicale, vaginale, conjunctivale sunt recoltate, de obicei, cu o ansă bacteriologică sterilizată prin flambare și bine răcită. Recoltarea din colul uterin se face în cursul examenului ginecologic cu ajutorul valvelor. Recoltarea se poate face și pe tampon de vată subțiri montate pe țigă din metal inoxidabil. La femeie, imediat după menstruație, se fac prelevări simultane din col, uretră și rect. În formele cronice de gonoree se poate recurge la reactivarea infecției cu băuturi alcoolice, vaccin tifoidic, instilații cu nitrat de argint, de la bărbat cu infecție cronică și secreție redusă se recoltează "picătura matinală", înainte ca bolnavul să fi urinat, de preferință după un masaj prealabil de prostată.

Exsudatul articular este recoltat prin puncție aseptică cu seringă și acul. Din produsele recoltate se fac frotiuri care se colorează prin metoda Gram (se

preferă fixarea cu alcool metilic, 5 min.). Se urmărește reacția leucocitară și prezența diplococilor Gram-negativi situați mai ales intracelular.

Produsele sunt înșănătăte pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, preferabil imediat după recoltare. Dacă acest lucru nu este posibil, recoltarea se face peampoane, care sunt trecute în mediul Stuart de transport și trimise la laborator pentru prelucrare.

Înșănătarea se face pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, prin dispersii cu ansa pentru obținerea de colonii izolate; incubarea se face obligatoriu în exicator cu atmosferă de CO₂ 5-10%, realizată prin procedeu lumânării, timp de 24-48 h. Se urmărește apariția coloniilor mici, translucide de gonococ, care sunt repicate pe mediu neselectiv; se efectuează, concomitent, controlul microscopic pe frotiuri colorate Gram și reacția oxidazei care este pozitivă, după care se execută antibiograma.

Epidemiologie. Blenoragia este o boală transmisă pe cale venereană. Sursa de infecție este reprezentată de omul bolnav și, în primul rând, de femeia cu gonoree cronică asimptomatică. Principalele mijloace de prevenire a îmbolnăvirilor constau în depistarea activă a blenoragiei, prin controale periodice bacteriologice, mai ales la femei și executarea unui examen de laborator complet în toate cazurile în care există suspiciunea unei infecții gonococice, inclusiv aplicarea unui tratament corect în funcție de datele furnizate de antibiogramă, pentru a împiedica cronicizarea bolii. De asemenea, trebuie făcută prin toate mijloacele o educație sanitară susținută pentru cunoașterea bolii și a importanței unui diagnostic de laborator, precoce, care permite un tratament corect și o vindecare completă.

Oftalmia gonococică a nou-născutului poate fi prevenită prin instilarea în conjunctivă a unei soluții bactericide cu nitrat de argint 1% sau cu penicilină.

Cap. XV. BACILII GRAM-NEGATIVI

1. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Generalități. Este o familie bacteriană alcătuită din numeroase specii de bacili Gram-negativi, nesporulați, mobili – cu cili peritrichi – sau imobili, care se cultivă ușor pe medii de cultură simple, fermentează glucoza, cu sau fără producere de gaz și reduc nitrații în nitriți. Sedul obișnuit al acestor germeni este intestinul uman și al animalelor.

Clasificare. Familia *Enterobacteriaceae* se subimparte în triburi, genuri sau grupuri și specii.

Clasificarea bacteriilor aparținând familiei *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1981)

Triburi	Genuri
I Eschericheae	1. Escherichia 2. Shigella
II Edwardsiellae	1. Edwardsiella
III Salmonellae	1. Salmonella 2. Arizona 3. Citrobacter 1. Klebsiella 2. Enterobacter 3. Serratia 4. Hafnia
IV Klebsiellae	1. Proteus 2. Providencia 3. Morganella 1. Yersinia 1. Erwinia 2. Pectobacterium
V Proteae	
VI Yersiniaceae	
VII Erwiniaceae	

Încadrarea unei bacterii într-un anumit trib, gen sau specie se face pe baza caracterelor de cultură, a comportamentului biochimic, a structurii antigenice, a patogenității și a sensibilității la acțiunea anumitor bacteriofagi.

Dintre testele biochimice mai frecvent utilizate, menționăm: fermentarea unor zaharuri și alcooli, producerea de indol, H₂S, urează, fenilalanin dezaminază, utilizarea citratului ca unică sursă de carbon, testul la roșu de metil (RM), Voges-Proskauer (V-P), lichefierea gelatinei, transformarea nitraților în nitriți etc.

Structură antigenică. Germenii din familia *Enterobacteriaceae* pot avea mai multe antigene: somatice, de înveliș și flagelare.

Antigenul "O" este un antigen somatic situat în corpul bacterian, fiind de natură glucido-lipido-polipeptidică. Este alcătuit dintr-un mozaic de fracțiuni antigenice existente într-o combinație specifică fiecărui grup de germeni.

Antigenul "K" este un antigen de înveliș, fiind situat la suprafața bacteriilor. Este de natură glucido-lipido-polipeptidică, ca și cele "O", dar diferă de acestea. Antigenele "K" sunt prezente numai la unele specii din familia *Enterobacteriaceae*. Ele poartă denumiri diferite: antigenul "Vi" la *Salmonella*, "L", "A" și "B" la *Escherichia* etc. Fiind dispuse la suprafața bacteriei, când sunt în cantitate mare pot împiedica contactul dintre antigenul "O" din corpul bacterian și anticorpii "O" din ser, astfel că fenomenul de aglutinare nu mai apare (tulpini "O" - inaglutinabile). Acest fapt creează dificultăți în diagnosticul serologic al unor astfel de tulpini.

Antigenul "H" este un antigen flagelar (ciliar), de natură proteică. El este specific de tip.

Cercetarea caracterelor de patogenitate. Pentru stabilirea patogenității unei *Enterobacteriaceae*, se determină virulența și toxicitatea germenului respectiv.

Virulența este invers proporțională cu numărul de germeni vii care produc moartea animalelor inoculate. Se stabilește D.C.L. (doza certă letală) sau D.L.₅₀ (doza letală 50%), aceasta din urmă exprimând mai exact valoarea acestui atribut al patogenității.

Toxicitatea este apreciată în funcție de moartea animalelor inoculate cu doze variabile de germeni omorâți prin căldură. Cu cât este mai mic numărul de germeni morți care omorâă animalele inoculate, cu atât tulpina bacteriană respectivă este mai toxică și, prin urmare, mai patogenă. Trebuie ținut cont de faptul că rezultatele obținute pe animal nu corespund totdeauna cu cele observate la om.

La unele *Enterobacteriaceae* se mai pot studia și acțiunile hemolitice, demonecrotică etc.

Cercetarea sensibilității la bacteriofag. Stabilirea lizotipului unei culturi bacteriene are numeroase aplicații practice: epidemiologice, terapeutice, în diagnosticul de laborator etc.

Prin specificitatea lor de acțiune, bacteriofagii pot subdiviza unele specii bacteriene (*Salmonella typhi* etc.) în lizotipuri. Cunoașterea lizotipului duce la aprofundarea diagnosticului de laborator, iar în cursul epidemiilor ajută la depistarea sursei de infecție, legătura dintre cazurile de boală etc.

În unele cazuri, preparatele fagice sunt utilizate în tratamentul unor afecțiuni produse de germeni din familia *Enterobacteriaceae*: colibaciloze, infecții urinare cu



Fig. 16. Structura antigenică la *Enterobacteriaceae*.

bacilul *Proteus* etc. *Enterobact* sunt: colibacilii, salmonelle și

1.1. BACILUL COLI (ESCHERICHIA)

Colibacilii se găsesc peste boală pot fi puși în evidență în

Caractere morfologice și t
grosi de 0,5μ, ciliați, ceca ce formează spori.

Caractere de cultură. Nu s
cultură obișnuit: bulion, apă
uniform bulionul și dau naștere
diametrul de 2-3mm. Formele
dau colonii rugoase cu margini

Caracterele biochimice. C
condiții de anaerobioză. Ei p
lactoza, produc indol, nu dese
activitate hemolitică și dermon

Rezistența la agenții fizi
îndelungat în mediul exterior. E
min. Sunt sensibili la acțiunea
sublimat etc. De asemen
cloramfenicolului, la unele su
colibacili sintetizează substanțe
fenomene de antagonism micro

Structura antigenică. Bac
prezența celor trei antigene prin
schema de identificare a diferite

Patogenitate. Cei mai mult
bacteriilor patogene sunt leg
(enterotoxină, neurotoxină
demonecrotică.

Boala la om. În anumite cor
afecțiuni locale sau generale:
endocardite, meningite, sept
imbolnăviri grave la copiii mici

Infecțiile urinare. Bacilul
infecțiile urinare spontane sa
instrumente de explorare a apar
facilitază, atunci când sunt prez

aceștia menționăm adезinele ale căror receptori sunt diseminați pe celulele arborelui urinar până la nivelul rinichului.

Infecțiile intestinale sunt provocate de *B. coli* zis "*enteropatogen*" care produce gastroenterita noului născut ce se propagă rapid și produce o mortalitate ridicată.

Bacilul coli "*enteroinvasiv*" are capacitatea conferită de o plasmidă de a invada celulele epiteliale ale colonului, de a se multiplica și de a produce reacții inflamatoare și ulceratii localizate.

Bacilul coli "*enterotoxigen*" produce diareea copiilor și a turștilor care voiajează prin țările calde. Puterea lor patogenă este legată pe de o parte de prezența pililor care joacă rol de factor de colonizare și care le permite să adere de celulele intestinului subțire, aderare urmată de multiplicare și pe de altă parte de producerea de toxine termolabile și termostabile care dereglează mecanismul normal de excreție/absorbție a acestor celule.

Bacilul coli "*enterohemoragic*" provoacă o diaree hemoragică.

Tratament. În cazul unei boli cauzate de bacilul coli, pe lângă tratamentul cu antibiotice și sulfamide (în funcție de rezultatul antibiogrammei), se poate administra ser anticolicobacilar sau se prepară un autovaccin din tulpina izolată de la bolnav.

Tratamentul cu bacteriofagi poate da rezultate bune, mai ales când este aplicat local. Bacteriofagi sunt virusuri capabile să infecteze și să distrugă celulele bacteriene.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor colibacilare. În infecțiile cu bacilul coli diagnosticul de laborator constă în izolarea și în identificarea germinilor din produsele patologice.

Recoltarea produselor de analiză se face în funcție de localizarea infecției: urină, materii fecale, sânge etc.

Hemocultura. În stările septicemice se recoltează, în condiții de perfectă sterilitate, sânge, care se însămânțează la patul bolnavului în bulion. Mediul astfel însămânțat este introdus în termostaț la 37°C. După 24h se face o trecere pe sub un tub de gelloză. Dacă s-a reușit cultivarea germinului din sânge, se va trece la identificarea sa prin cercetarea caracterelor morfologice, biochimice și serologice.

Coprocultura. Materiile fecale sunt însămânțate prin dispersie pe medii solide diferențiale care conțin lactoză și un indicator de pH, ca:

- gelloză lactozată tumesolată (mediul Drigalski); bacilul coli fermentează lactoza și virează mediul în roșu;
- gelloză lactozată cu cozină și albastru de metilen (mediul Levine). Colonile de bacili coli au o culoare negricioasă cu luciu metalic, spre deosebire de alte enterobacteriaceae care dau colonii roz-palide;
- gelloză lactozată cu albastru de bromtimol. Pe acest mediu bacilul coli formează colonii de culoare galbenă.

De pe mediile diferențiale se iau, cu ansa, coloniile suspecte și se trec pe gelloză nutritivă 2%, după care urmează identificarea germinilor izolați în cultură pură, prin studiul caracterelor morfologice, biochimice și serologice. În același mod se

procedează și cu alte produse patologice, cum sunt secrețiile purulente, bila, precum și cu alimentele incriminate în producerea imbolnăvirii.

Urocultura. După o recoltare corectă a urinei, în condiții de igienă riguroasă, se face o însămânțare direct din urină sau din sedimentul obținut prin centrifugare, se condiții de sterilitate, în bulion simplu și pe un mediu diferențial. Colonile suspecte sunt repicate și studiate în continuare pentru identificarea morfologică, biochimică și serologică (aglutinarea pe lamă și în tub).

Epidemiologie. Bacilul coli populează în mod normal intestinul uman chiar din primele zile de la naștere. Prin urmare, nu este practic posibil și nici necesar să distrugem acești germeni care fac parte din flora microbiană normală a omului sănătos. Există, însă, serotipuri enteropatogene care pot produce afecțiuni grave de tip epidemic la copii mici. Sursa de infecție a acestor boli intraspitalicești este reprezentată de bolnavi și purtători de colibacili patogeni. Pătrunderea germinilor în organism se face pe cale digestivă, răspândirea acestora fiind favorizată de nerespectarea unor reguli elementare de igienă personală. La apariția unor astfel de imbolnăviri se fac investigații pentru depistarea sursei și a căilor de transmitere și se iau toate măsurile pentru neutralizarea acestora în vederea stingerii focarului infecțios. Pentru prevenirea unor astfel de situații, în maternități, în servicii medicale pentru copii și în general în spitale, este necesar să se interzică sondajele uretrale inoportune și să se ia măsuri foarte riguroase care să împiedice introducerea și răspândirea infecțiilor colibacilare în aceste unități sanitare.

1.2. GENUL SALMONELLA

Este un grup biochimic al familiei *Enterobacteriaceae* format, ca și alte genuri ale acestei familii, din bacili Gram-negativi, mobili, nesporulați, cu o structură antigenică complexă și o patogenitate ridicată pentru om și animale.

Clasificare. Pe baza structurii antigenice a fost alcătuită o schemă de diagnostic în care genul *Salmonella* este divizat în *grupe* - cu antigene somatice comune - fiecare grupă fiind formată din *specii* ce se diferențiază prin antigene flagelare specifice.

În cadrul unei specii, diferențierea poate merge mai departe: unele tulpini de *Salmonella* au caractere biochimice diferite (*biotipuri*) sau o sensibilitate particulară față de bacteriofagi (*lizotipuri*).

Habitat. Germenii din grupul *Salmonella* se întâlnesc la omul bolnav sau la purtătorii de germeni, la mamifere, păsări și reptile. Pot fi, de asemenea, întâlniți în mediul extern în ape și pe sol, în alimente etc.

Caractere morfologice și tinctoriale. *Salmonellele* se prezintă sub forma unor bastonașe lungi de 2-3μ și groase de 0,6μ. Sunt bacili mobili (cu foarte rare excepții), cu cili peritrichi bine dezvoltati, nu formează sporii, nu au capsule și sunt Gram-negativi.

Caractere de cultură. Sunt germeni aerobi și facultativ anaerobi. Cresc pe medii de cultură simple (bulion, apă peptonată, gelloză nutritivă etc.). Se pot disocia în forme

la unele antibiotice cu spectru larg de acțiune (cloramfenicol, kanamicină) și la acțiunea litică a unor bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. Germenii din acest gen sunt foarte heterogeni din acest punct de vedere. Antigenele "O" și "H" pe care le posedă nu permit o utilizare practică a diagnosticului serologic. Unele specii de *Proteus* imobile (OX19, OX2 și OXK) au antigene comune cu rickettsiile, motiv pentru care sunt utilizate în diagnosticul serologic al tifosului exantematic (reacția Weil-Felix).

Caractere de patogenitate. Bacilii *Proteus* sunt întâlniți frecvent la om ca germeni saprofiti. Uneori, ei provoacă toxinfecții alimentare, infecții urinare, otite, meningite și chiar septicemii cu evoluție gravă.

Inoculați la animale de laborator (iepure, șoarece, cobai) produc în câteva zile o septicemie mortală.

Imunitatea omului și a animalelor față de infecția cu bacilul *Proteus* nu pare a fi prea importantă. Trebuie luată însă în considerare heterogenitatea antigenică, atât de marcată, existentă la acești germeni.

Tratamentul. Există tulpini de *Proteus* foarte rezistente la numeroase antibiotice. Pentru acest motiv, în unele cazuri, la tratamentul cu antibioticele sau chimioterapicele indicate de antibiogramă este necesară asocierea unei administrări de vaccinuri preparate din tulpina proprie a bolnavului (autovaccin) și de bacteriofagi specifici.

Diagnosticul de laborator. Constă în izolarea și identificarea germeniilor din produsele patologice cu stabilirea spectrului de sensibilitate la antibiotice și chimioterapice și, eventual, la bacteriofagi specifici.

În acest scop se recoltează, în funcție de localizarea bolii, materii fecale, secreții purulente, urină, L.C.R., sânge etc. Recoltarea trebuie făcută în cele mai bune condiții, pentru a se evita contaminarea accidentală, ținându-se seama de faptul că bacilii *Proteus* pot fi întâlniți peste tot.

Frotiuri efectuate direct din produs au numai o valoare orientativă.

În general, bacilul *Proteus* este ușor de izolat, dacă produsul patologic este înșănănat în lichidul de condensare al unor tuburi cu geloză nutritivă înclinată. Datorită marii lor mobilități, bacilii *Proteus* vor invade întreaga suprafață a mediului (fenomenul de câlțurare) și vor fi obținuți în cultura pusă la parca superioară a paniei. Izolarea bacilului *Proteus* poate fi obținută și prin dispersie pe medii selective folosite pentru alte *Enterobacteriaceae*. Aceste medii inhibă, prin sărurile biliare pe care le conțin, expansiunea bacililor *Proteus* și permit obținerea unor colonii izolate, caracteristice (colonii cu centrul opac, verde-închis și periferia mai deschisă pe mediul *Isral-Meier* sau colonii cu centrul opac, brun și periferia decolorată pe mediul SS). În continuare, după efectuarea unor frotiuri colorate Gram (bacili Gram-negativi, polimorfi), se cercetează caracteristicile biochimice ale culturii și, în primul rând, punerea în evidență a ureazei, a transformării fenil-alaninei în acid fenil-piruvic și a triptofanului în acid-indol-acetic.

Pentru informații suplimentare se poate efectua și reacția de aglutinare cu seruri imune specifice.

Testarea sensibilității germenului la antibiotice și chimioterapice este obligatorie. Când este posibil, se va testa și sensibilitatea la bacteriofagi.

Epidemiologie. Afecțiunile produse de germenii din genul *Proteus* au devenit o problemă importantă în cadrul infecțiilor intraspitalicești, datorită selecționării unor tulpini polirezistente la antibiotice și având o capacitate de infecțiozitate sporită.

Combaterrea și profilaxia acestor infecții se bazează pe asigurarea condițiilor igienice de preparare și de manipulare a antibioticelor cu spectru larg de acțiune și, în general, pe asigurarea măsurilor de profilaxie a infecțiilor intraspitalicești.

1.4. GENUL *KLEBSIELLA*

Germenii cuprinși în acest grup biochimic al familiei *Enterobacteriaceae* sunt, în general, saprofiti ai tubului digestiv și ai căilor aeriene superioare. În anumite condiții favorizante ei pot provoca boli ale aparatului respirator, infecții urinare, meningite, otite etc.

Klebsiella pneumoniae este specia patogenă cea mai frecvent întâlnită în afecțiunile menționate.

Klebsiella rhinoscleromatis este întâlnită în rinoscclerom, iar *Klebsiella ozenae* este prezentă la boavii de ozenă.

La acestea, ulterior (1981), au mai fost adăugate genurile *Enterobacter*, *Serratia* și *Hafnia*.

Caracterele morfologice și tinctoriale. *Klebsiellele* sunt bacili Gram-negativi, scurți, cu capete rotunjite, cu capsulă evidentă, mai ales în produsele patologice, imobili, nesporulați.

Caractere de cultură. *Klebsiellele* cresc abundent pe medii obișnuite. În mediile lichide formează la suprafață un inel sau chiar un val care ulterior cade la fundul tubului. Formele capsulate dau pe geloză colonii mari, vâscoase.

Caractere biochimice și de metabolism. Sunt germeni aerobi și facultativ anaerobi, fermentează glucoza și numeroase alte zaharuri cu producere de gaz; nu formează indol și H₂S și nu lichefiază gelatină; reacția la roșu de metil și testul la fenilalanină sunt negative; formează acetil-metil-carbinol (reacția Voges-Proskauer pozitivă), descompun ureea și cresc în prezența malonațului de sodiu și a KCN. Caracterele biochimice sunt folosite pentru identificarea și clasificarea *klebsiellelor*.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. *Klebsiellele* sunt omorâte prin încălzire la 55...60°C, dar pot persista mai multe săptămâni în natură dacă au condiții favorabile. Sunt sensibile la unele antibiotice cu spectru larg (aureomicină), dar sunt rezistente la penicilină.

Structura antigenică. Se cunosc trei antigene: "O", "R" și "K". Antigenul "O" se întâlnește la formele "S", antigenul "R" la formele "R" și antigenul "K" la formele capsulate. Antigenul capsular este termolabil și împiedică punerea în evidență a antigenului "O".

Pe baza antigenelor "O" și "K" a fost stabilită o schemă antigenică de diagnostic.

Caractere de patogenitate. Alături de numeroase tipuri de *Klebsiella* saprofite se pot întâlni și unele specii patogene pentru om care produc pneumonii, bronșite, pleurizii, infecții urinare, otite, meningite, colicistite etc. Uneori, acești germeni pot produce infecții intraspinalicești.

Soarecele alb este sensibil la infectarea cu *Klebsiella*. Animalele inoculate subcutanat fac o septicemie mortală.

Tratamentul infecțiilor produse de *Klebsiella* se bazează pe utilizarea unor antibiotice cu spectru larg de acțiune în funcție de rezultatele furnizate de antibiogramă.

Diagnosticul de laborator. Pentru izolarea și identificarea germinilor se recoltează diferite produse patologice ca: secrețiile purulente, sputa, urina, L.C.R., bila etc. Însămânțarea acestora se face pe medii simple, obisnuite. După o incubare de 18-24 h la temperatură (37°C), *Klebsiella* formează o peliculă la suprafața mediilor lichide și colonii mucoase, mari, pe mediiile solide. Pe frotuurile colorate Gram, germeni apar sub forma unor bacili gram-negativi, de mărime inegală. Colorații speciale pun ușor în evidență capsula bacteriană existentă, mai ales la germeni din produsele patologice.

Folosirea tehnicii de aglutinare pe lamă sau a testului de umflare a capsulei în prezența serurilor imune specifice sunt utile, dar ele nu au intrat în practica curentă, din cauza dificultăților legate de numărul mare de tipuri serologice existente.

Studiul caracterelor biochimice este absolut necesar pentru precizarea apartenenței germinului cercetat la grupul *Klebsiella*, ca și încadrarea sa într-una din speciile acestui gen.

Izolarea rapidă a *klebsielor* dintr-un produs patologic poate fi obținută prin inocularea subcutanată la șoarece. Animalul face septicemie și moare în scurt timp, astfel că germeni pot fi izolați în cultură pură sau pot fi examinați direct pe amprentele din organe.

Testarea sensibilității germinului izolat la antibiotice și chimioterapice se face totdeauna pentru aplicarea unui tratament corect.

Epidemiologie. Măsurile de prevenire a infecțiilor cu germeni din genul *Klebsiella* sunt în principal cele de aplicare corectă a regulilor de igienă sau de asepse strictă în efectuarea unor manevre terapeutice sau de diagnostic. Acestea sunt cu atât mai necesare cu cât se cunoaște că există numeroase tulpini de *Klebsiella*, în special cele izolate în spital, care prezintă o rezistență marcată la numeroase antibiotice.

1.5. BACILUL DIZENTERIC (SHIGELLA SP)

Germenii din acest grup produc dizenterie bacilară. Bacilii dizenterici sunt găsiți în materiile fecale ale bolnavilor de dizenterie și ale purtătorilor. De asemenea, ei pot fi întâlniți în unele alimente contaminate, ape poluate etc.

Caractere morfotinctoriale. Sunt bacili Gram-negativi, imobili, nu formează spori și nu sunt capsulați.

Caractere de cultură și metabolism. Bacilii dizenterici cresc ușor pe mediiile de

cultură simple. Sunt aerobi și facultativ anaerobi, fermentează glucoza dar nu fermentează lactoza, nu lichefiază gelatina, nu formează hidrogen sulfurat. În general, bacilii dizenterici sunt puțin rezistenți în mediul extern. În materiile fecale sunt distruși prin concurență de alți germeni și, de aceea, înșămânțarea trebuie făcută imediat după recoltare. În alimente și în apă, în condiții favorabile de temperatură, pH etc. pot supraviețui câteva zile sau chiar săptămâni.

Sunt distruși destul de rapid de substanțele antisepice obișnuite (fenol, sublimat etc.). Sunt sensibili la acțiunea unor sulfamide, la streptomicină și, mai ales, cloramfenicol, dar sunt insensibili la penicilină.

Germenii din acest grup sunt imobili: ei nu posedă antigen H. De aceea, diferențierea dintre tipurile serologice se face pe baza antigenului O.

Patogenitatea germinilor. Este legată de prezența unei endotoxine, iar la unii dintre aceștia și de elaborarea unei exotoxine puternice. Aceste toxine acționează asupra tubului digestiv și a sistemului nervos.

Boala la om. Este reprezentată de dizenteria bacilară, care se manifestă prin febră, frisoane, dureri abdominale, diaree cu scaune mucoase, purulente și sanguinolente. Epidemiile cele mai grave, cu cea mai ridicată mortalitate, sunt produse de bacili dizenterici care produc exotoxină.

Boala se localizează pe intestinul gros, unde se produce o inflamație a peretelui și ulcerări ale mucoasei intestinale. Uneori se produce o cronicizare a bolii, care poate dura ani de zile.

Imunitate. Există o rezistență diferită a oamnelor față de infecție. Vaccinarea cu germeni omorâți nu dă rezultate satisfăcătoare. Vaccinarea cu germeni vii, nepatogeni, pare promițătoare.

Tratament. Se folosesc sulfamide și antibiotice (streptomicină, cloramfenicol etc.).

În cazul unor boli grave cu aspect toxic evident, se utilizează ser antidizenteric polyvalent.

Diagnosticul de laborator al dizenteriei bacilare. Diagnosticul bacteriologic al dizenteriei bacilare se bazează pe izolarea și identificarea germinilor în materiile fecale ale bolnavilor sau ale purtătorilor de germeni, în alimentele și apa contaminate.

Recoltarea materiilor fecale se face astfel: la bolnavii cu forme acute se recoltează cât mai la începutul bolii materiile fecale emise spontan. În mucus, puroi și fragmente de mucoasă se găsește numeroși bacili dizenterici. Deoarece antibioticele și sulfamidele împiedică dezvoltarea germinilor pe mediiile de cultură, se recomandă ca recoltarea materiilor fecale pentru coprocultură să fie făcută înainte de începerea tratamentului.

La bolnavii cu dizenterie cronică și la purtătorii de bacili dizenterici, recoltarea se face, de preferință, cu o sondă sau cu un tampon de vată, utilizând pentru aceasta rectoscopul.

Este recomandabil ca înșămânțarea să se facă cât mai curând după recoltare. Când

acest lucru nu este posibil, probele trebuie ținute la gheață sau trebuie să se adauge un lichid conservant.

Însămânțarea produselor patologice se face pe medii de cultură ca:

- Mediu Leifson (D.C.A. = deoxicicolat-citrat-agar). Pe acest mediu, coloniile de bacili dizenterici sunt transparente;
- Mediu cu bilă uscată (Israli-Meierl). Pe acest mediu, care înainte de însămânțare are culoare verde-închis, coloniile de bacili dizenterici sunt verzi sau verzii-albastre.

Culturile obținute sunt studiate pentru precizarea caracterelor morfologice, biochimice și serologice.

Caracterelor morfologice și tinctoriale sunt cercetate pe preparate proaspete și pe frotiuri colorate. În cazul prezentei baciliilor dizenterici vor fi puși în evidență bacili Gram-negativi, imobili.

Caracterelor biochimice ale germinilor izolați sunt studiate după tehnicile generale utilizate pentru *Enterobacteriaceae*.

Identificarea serologică. Este un procedeu rapid de recunoaștere a baciliilor dizenterici. În practică, după obținerea primelor culturi pure (chiar de la primele colonii izolate), se trece la aglutinarea rapidă pe lamă cu seruri aglutinante antidizenterice. Aglutinarea pe lamă dă o primă orientare. Când este pozitivă, ea trebuie urmată de o aglutinare în tub.

Epidemiologie. Dizenteria este o boală digestivă în care germeii pătrund în organism odată cu consumul de apă sau alimente contaminate. Boala este răspândită în toată lumea și apare fie sporadic, fie sub formă de focare epidemice. În dizenterie, izvorul de infecție este reprezentat atât de omul bolnav, acut sau cronic, cât și de purtătorii de germeni.

Transmiterea bolii se poate face prin contact direct cu produsul patologic care provine de la bolnavi sau purtători, dar cel mai adesea această transmitere se face indirect prin obiecte, apă și alimente contaminate sau prin intermediul muștelor. În colectivitățile de copii și în mediul familial, mâinile murdare reprezintă principalul factor de transmitere a dizenteriei. Apa contaminată poate, de asemenea, provoca epidemii întinse de dizenterie bacilară. Alimentele în special laptele și produsele lactate încorect sterilizate sau manipulate neigienic, ca și fructele, zarzavaturile și legumele nespălate pot constitui o cale de transmitere a dizenteriei. În sezonul cald muștele sunt un mijloc important de vehiculare a bacilului dizenteric de la produsul patologic la alimente, apă etc.

Receptivitatea oamenilor la dizenterie este generală. Boala este mai frecventă la copiii mici și la bătrâni. După boală se instalează o imunitate de scurtă durată și numai față de tipul de bacil dizenteric care a produs îmbolnăvirea.

Măsuri de profilaxie și de combatere. Bolnavii trebuie diagnosticați cât mai curând de la declanșarea bolii, iar purtătorii vor fi depistați și luați în evidență.

Se va face un control microbiologic la angajare și periodic al lucrătorilor din

sectorul alimentar și din colectivitățile de copii pentru depistarea activă a unor purtători.

De asemenea, se vor lua măsuri de neutralizare a căilor de transmitere prin protejarea apei și a alimentelor și prin distrugerea muștelor.

Protecția populației receptivă se face printr-o muncă susținută de educație sanitară, pentru căpătarea unor deprinderi igienice, cum ar fi spălarea mâinilor înainte de masă, consumul fructelor și al zarzavaturilor numai după spălarea insistență a acestora la jet de apă etc.

Vaccinarea antidizenterică se face în țara noastră cu vaccinul viu, nepatogen, "VADIZEN" produs de Institutul Cantacuzino fiind obținute rezultate promițătoare.

2. VIBRIONUL HOLERIC (VIBRIO COMMA)

Genul *Vibrio* este alcătuit din bacterii Gram-negativ, foarte mobile, care au formă de bastonaș ușor curbat. Majoritatea speciilor aparținând acestui gen sunt saprofite, nu sunt holigerene. Alte produse imbolnăviri ușoare. *Vibriionul holerice*, descoperit de Robert Koch spre sfârșitul secolului trecut într-o epidemie de holeră în Egipt, este cel mai important reprezentant al genului *Vibrio* și este holigeren.

Vibriionii holigereni sunt de două feluri:

- a) vibriionii hemolitici: - tipul I: *V. Inaba*;
- tipul II: *V. Ogawa*;
- tipul intermediar: *V. Hikojima*
- b) vibriionii nehemolitici: *El Tor* și tulpinile *Celebes*

Habitat. Vibriionii holigeri pot fi izolați de la omul bolnav sau purtător, din apele poluate, de pe pământul sau obiectele contaminate.

Caractere morfologice și tictoriale. Vibriionul holerice are formă de bastonaș ușor curbat, lung de 2-3 μ și gros de 0,5 μ , prelungit cu un cil la unul din capetele sale. Nu are capsulă și nu formează spori. Se colorează ușor cu fucsina diluată 1/10.

Caractere de cultură. Vibriionul holerice se dezvoltă rapid pe medii de cultură simple cu un pH alcalin 8-9. În apa peptonată formează, după câteva ore de incubare la 37°C, o cultură vizibilă și un vâl la suprafața mediului. Pe mediile solide formează coloni caracteristice: cenușii, translucide, cu suprafața netedă și cu centrul mai proeminent și mai dens.

Caractere biochimice și de metabolism. Vibriionul holerice este un germen aerob, fermentază manoză și zaharoza, nu fermentază arabinoză; lichefiază gelatina, produce H_2S și indol, reduce nitrati în nitriți, iar testul oxidazei este pozitiv. Unii vibriionii sunt hemolitici.

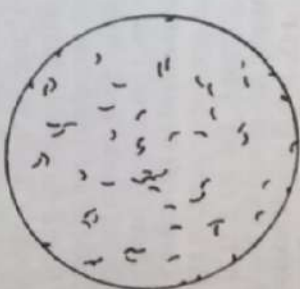


Fig. 18. Vibriionul holerice.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Vibrionii holerei sunt distruși în câteva ore de radiațiile solare, în 30-40 min de radiațiile ultraviolete, într-o oră prin încălzire la 50°C și foarte rapid prin fierbere. Ei rezistă, totuși, un timp destul de îndelungat în apă și alimente.

Vibrionii holerei sunt foarte sensibili la substanțele antiseptice obișnuite: sublimat, formol, fenol, cloramină etc. Ei sunt sensibili la tetraciclina, streptomycină, dar rezistenți la penicilină. Sunt, de asemenea, sensibili la bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. Vibrionii au două antigene principale: antigenul somatic "O" și antigenul flagelar "H". Dintre acestea, numai antigenul "O" este specific. Pe baza antigenului "O" vibrionii au fost împărțiți în mai multe grupe. Vibrionii holerei hemolitici (Inaba, Ogawa și Hykajima), ca și cei nehemolitici (El Tor și Celebes) aparțin grupei "O-1". Dintre fracțiunile antigenice existente la grupa "O-1" cea mai importantă este factorul "A", care se găsește exclusiv în acest grup. Factorii B, C, D, E etc. pot fi întâlniți și la vibrionii neholerici. Vibrionii care nu produc holera fac parte din celelalte grupe "O" care nu posedă factorul "A".

Caracteristicile de patogenitate. Vibrionii holerei au o virulență foarte variabilă. În cursul unei epidemii sau chiar la același bolnav pot fi izolați vibrioni foarte virulenți și vibrioni holerei lipsiți complet de virulență. Acțiunea toxică a vibriunilor holerei se datorează unei endotoxine foarte active.

Holera este o boală infecțioasă specifică omului. Bolnavii de holera prezintă dureri abdominale, diaree, vărsături, o deshidratare rapidă și o stare de intoxicație profundă. Unele epidemii s-au soldat cu o mortalitate deosebit de ridicată. Scaunele bolnavilor, în număr foarte mare, conțin fragmente de mucoasă intestinală și un număr mare de vibrioni holerei.

Imunitatea. După boală sau după vaccinarea antiholerică, deși pentru o perioadă de timp mai scurtă, se instalează o imunitate antitoxică și antiinfecțioasă destul de puternică.

Tratament. Pe lângă aplicarea unui regim igienico-dietetic, cu rehidratarea masivă, administrarea de antibiotice (în primul rând tetraciclina) este, totdeauna, indicată atât pentru vindecarea bolnavului, cât și pentru evitarea stării de purtător de germeni.

Diagnosticul de laborator. Având în vedere gravitatea și rapiditatea cu care epidemia se poate extinde, diagnosticul holerei, în care laboratorul are un rol decisiv, trebuie stabilit cu maximă urgență. În laboratoarele care stabilesc acest diagnostic se iau măsuri excepționale pentru evitarea contaminării personalului și pentru a împiedica orice posibilitate de răspândire a germeului în afara ariei de lucru. Aceleași măsuri drastice se iau și la recoltarea și transportul produselor patologice.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea vibriunilor holerei la bolnavi, contacti și purtători, iar în caz de epidemie, de la cadavre, din apa și din alimentele contaminate.

Recoltarea produselor patologice (materiilor fecale, vomismente, conținutul intestinal sau al veziculei biliare la cadavre, alimentele și apa infectate) se face în recoltare speciale, din material plastic, care nu sunt utilizate decât o singură dată. Pentru fiecare probă se întocmește o fișă cu numele și adresa persoanei, data și ora recoltării, diagnosticul clinic, tratamentul efectuat înainte de recoltare etc. Când recoltarea a fost făcută după începerea tratamentului, coprocultura se va repeta la 24 și 48 h după terminarea administrării medicației antibacteriene.

La bolnavi se recoltează vomismentele și scaunele emise spontan, iar la purtători sâmbloși și convalescenți (după cel puțin 2-3 zile de la vindecare) materiile fecale sunt recoltate după administrarea unui purgativ salin. Cu ajutorul lingurii recoltorului se ia 1 g de materii fecale sau 1-2 ml din scaunul lichid și se introduce în mediul de transport și conservare Carry-Blair din coprocultor.

De la bolnav, recoltarea se poate face și cu o sondă Nelaton sterilă, care este introdusă în rect 20-25 cm și, după manevra de sifonare, se descarcă produsul în mediul de conservare sau direct într-un mediu de îmbogățire, de exemplu apa peptonată 1% alcalină (pH=9).

Examenul microscopic direct este posibil când în produs există un număr mare de vibrioni și el se poate face cu imersia pe frotiuri colorate după metoda Gram, cu fluorescență 1/110, când se constată prezența vibriunilor colorați în roșu sau prin examinarea pe fond întunecat a unui preparat proaspăt (o picătură din scaun diareic sau vâl de la suprafața mediului de îmbogățire) între lamă și lamelă. În acest din urmă caz se pun în evidență mișcările foarte vii ale vibriunilor holerei. Când aceștia există, pentru precizarea diagnosticului se fac în continuare patru preparate proaspete pentru testul de imobilizare: 1) o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinant bivalent anti-Inaba și anti-Ogawa; 2) o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinant absorbit anti-Inaba; 3) o picătură din materialul de testat + o picătură de ser fiziologic (martor). Serurile nu trebuie să conțină substanțe prezervante. Imobilizarea germeilor pe primul preparat și pe unul din următoarele două, cu păstrarea mobilității pe preparatul-martor, presupune existența vibriunilor holerei în materialul de cercetat.

Tot pentru un diagnostic foarte rapid se poate recurge și la **testul de imuno-fluorescență**, care poate permite depistarea vibriunilor holerei direct în produsele patologice sau în mediul de îmbogățire. Rezultatele sunt însă numai orientative, din cauza reacțiilor fals pozitive produse de existența la unele *Enterobacteriaceae* a unor fracțiuni antigenice comune cu vibriunul holerei.

Pentru cultivarea vibriunilor holerei, produsele patologice ca atare sau din mediul Carry-Blair sunt însemnate cu ansa sau direct cu lingurița recoltorului pentru îmbogățire, în tuburi cu apă peptonată alcalină, după ce, în prealabil, au fost omogenizate.

După 5-6 h de incubare la 37°C se cercetează vâul format sau, în lipsa acestuia, cultura de la suprafață, la microscopul cu fond întunecat, inclusiv aplicarea testului de imobilitate, pentru decelarea vibriunilor holerei.

Totodată, se fac treceri pe un tub cu apă peptonată alcalină pentru o nouă îmbogățire și dispersii pe plăci Petri cu medii solide: geloză nutritivă și medii selective, ca mediul B.S.A. (agar cu săruri biliare) și mediul T.C.B.S. (tirosulfat, citrat, bilă, sucroză).

Pe plăcile cu geloză sau cu mediul B.S.A., primele colonii apar după 10-12 h de incubare la temperatură; ele sunt transparente și clare, spre deosebire de coloniile dense și opace formate de alți germeni. Examinarea se face și după 18-24 h.

Pe mediul T.C.B.S., examinarea se face după 18-24 h de menținere la temperatură. Coloniile formate de vibriunii holerei sunt netede, ușor convexe, cu centrul opac și marginile transparente, de culoare galbenă-portocalie și cu o zonă galbenă în jur.

Identificarea serologică se face la început pe coloniile suspecte de pe geloză sau de pe mediul B.S.A. și, ulterior, pentru confirmare, pe culturile repicate pe geloză înclinată sau pe mediul poliotrop T.S.I. În acest din urmă caz sunt reținute numai tuburile care prezintă acidifierea (îngălbenirea) fără gaz a mediului solidificat în poziție dreaptă și alcalinizarea (împroșirea) mediului solidificat în poziție înclinată. Aglutinarea pe lamă se face cu ser antiholeric bivalent (Inaba și Ogawa) subgrup O1, în paralel cu un martor cu ser fiziologic tamponat și, în continuare, cu seruri aglutinate monovalente absorbite Inaba și Ogawa.

Testul oxidazei, care la vibriunul holerice este pozitiv, se execută prin punerea a 1-2 picături de reactivi (clorhidrat de tetrametil-parafenilendiamină 0,5 - 1% în apă distilată) peste colonia suspectă, urmărindu-se schimbarea culorii (reacția pozitivă) de la albastru-închis la negru.

În continuare se cercetează producerea de indol și H₂S, reacțiile roșu de metil și Voges-Proskauer, fermentarea zaharurilor și prezența unor enzime.

Vibriunul holerice produce indol, dă reacții pozitive la roșu de metil și produce H₂S. Reacția Voges-Proskauer este pozitivă într-un procentaj foarte mare la tulpinile El Tor. De asemenea, fermentează glucoza fără formare de gaz, manoză, zaharoza și manita, dar nu fermentează lactoza, arabinoza și inozita. Produce lizin-decarboxilază, și ornitin-decarboxilază, dar nu produce arginin-dehidrolază. Posedă gelatinază, colagenază, lecitinază, elastinază și mucinază.

Diagnosticul serologic prin care se cercetează nivelul anticorpilor aglutinani este practicat pentru depistarea purtătorilor. În acest caz se recoltează două probe de ser la interval de 2-3 săptămâni. Rezultatul se ia în considerare numai dacă titrul aglutinant a crescut în proba a doua de cel puțin 4 ori în comparație cu cel al primei probe.

Epidemiologie. Holera este o boală digestivă endemicoepidemică, specifică omului. Epidemiile de holera izbucnesc brusc și se răspândesc rapid, dând naștere la pandemii persistente.

Izvorul de infecție este constituit de omul bolnav sau purtător de germeni. În general, starea de purtător nu durează mai mult de 3-4 săptămâni de la vindecarea clinică sau de la ultimul contact infectant.

Transmiterea vibriunului holerice de la om la om se poate face și prin contact direct, prin mâinile murdare, dar în mod obișnuit transmiterea se face indirect prin apă, alimente, muște și obiecte contaminate.

Receptivitatea la boală este generală, dar copiii sunt cei mai expuși.

Profilaxia holerei se bazează în special pe aprovizionarea cu apă potabilă controlată, evacuarea corectă a reziduurilor fecaloide-mecanice și educația sanitară a populației.

Cap. XVIII. BACILUL TUBERCULOS SAU BACILUL KOCH (*Mycobacterium tuberculosis*)

În genul *Mycobacterium* sunt cuprinse atât specii saprofite, cât și specii patogene, care prezintă o deosebită importanță pentru patologia umană și animală. Dintre acestea din urmă, menționăm pe cele mai importante. *Mycobacterium tuberculosis* sau bacilul tuberculos, cu varietățile *hominis* și *bovis*, care produc tuberculoza, și *Mycobacterium leprae*, care produce lepra.

Habitat. Bacilul tuberculos manifestă un parazitism strict. El este prezent în leziunile omului sau ale animalelor bolnave de tuberculoză. Poate fi găsit, de asemenea, în praful din încăperile în care a fost răspândită sputa baciliferă sau pe obiectele contaminate de bolnav.



Fig. 20. Bacilul tuberculos
(frotiu din spută)

Caractere de cultură. Spre deosebire de micobacteriile saprofite, care se dezvoltă ușor și rapid chiar pe mediiile de cultură simple, micobacteriile patogene se dezvoltă lent pe medii speciale. Adăugarea glicerinei la mediiile de cultură favorizează dezvoltarea bacilului tuberculos uman, în timp ce tipul bovin este parțial inhibat.

Pe mediiile lichide micobacteriile formează la suprafață un vâl subțire care se îngroașă treptat. Pe măsură ce se îngroașă, vâlul se cutăză, se fragmentează și cade la fundul recipientului, iar la suprafață începe să se formeze un nou vâl. Bacilii tuberculoși de tip uman fac un vâl mai gros decât cel bovin și alcalinizează la început

Caractere morfologice și tinctoriale. Sunt bacili subțiri, uneori cu ramificații, drepti sau ușor curbăți, cu granulații ce sunt puse în evidență prin colorații speciale, imobili, nesporulați, necapsulați. Spre deosebire de alți germeni, micobacteriile, datorită unei compoziții chimice particulare, în care predomină lipidele, se colorează foarte greu și, ulterior, rezistă la decolorarea cu alcool și acizi minerali diluați. Din acest motiv, micobacteriile sunt denumite "bacili acid-alcool-rezistenți". Pentru a fi puse în evidență, se folosește colorația Ziehl-Nielsen. Pe frotiuurile colorate după această metodă, bacilul tuberculos apare colorat în roșu aprins, datorită fuscinei, în timp ce restul de germeni, celule sau alte elemente, sunt decolorate de acizi și alcool, fiind ulterior recolorate cu albastru de metilen.

mediul, apoi îl acidifică progresiv, spre deosebire de tipul bovin care alcalinizează mediul la început, dar ulterior nu-l mai acidifică.

Pe mediiile solide, primele colonii de bacil tuberculos tip uman apar după 10-15 zile de la însemnare, sub forma unor puncte albe care, cu timpul, se măresc și fuzionează. Coloniiile sunt de tip "R", mate, zăburite, cu tendința la pigmentare. Bacilii tuberculoși de tip bovin formează primele colonii vizibile după 20-60 de zile. Bacilii paratuberculoși dau naștere la colonii vizibile după 48-72 h.

În general, din bacilii tuberculoși nu putem obține suspensii omogene.

Caractere biochimice și de metabolism. Micobacteriile sunt germeni aerobi. Bacilii tuberculoși de tip uman și bovin se dezvoltă optim la o temperatură de 37-38°C și la un pH de 7,4 pentru tipul uman și 8,0 pentru tipul bovin.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Sunt germeni foarte rezistenți. Pot persista luni și chiar ani de zile, mai ales în medii albuminoase. În stare uscată, pot suporta temperaturi de 70°C peste 7 h. Radiațiile ultraviolete au o acțiune bactericidă marcată asupra bacilului tuberculos.

Rezistența la agenții chimici este foarte variabilă: acidul sulfuric 10% și hidranul de sodiu 4% nu influențează viabilitatea bacililor tuberculoși după un contact de jumătate de oră. Dintre substanțele antiseptice, cele mai active sunt fenolul 5%, tricrezolul 2% și izolul 2%, care omoră o cultură de bacil tuberculos în câteva minute.

Mycobacterium tuberculosis manifestă o rezistență totală față de majoritatea antibioticilor: este sensibil la streptomycină, hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), cicloserină etc. Unele micobacterii sunt sensibile și la bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. Deși fracțiunile lipidice, glucidice și proteice ale micobacteriilor exercită o anumită activitate antigenică, provocând în organismul infectat formare de anticorpi (aglutinanți, precipitanți, fixatori de complement), specificitatea acestora nu este suficientă pentru a permite diferențieri serologice de tip. Lipsa de specificitate face posibilă o imunitate încrucișată, astfel că bacilii de origine bovină (B.C.G.), utilizați în vaccinare produc o protecție evidentă împotriva infecției cu bacilul tuberculos uman.

Caractere de patogenitate. Virulența micobacteriilor pare să fie legată de existența unei substanțe lipidice, denumită "cord-factor" care lipsește la micobacteriile avirulente. În plus, bacilii patogeni produc în organismul infectat și fenomenele de intoxicație care agravează mersul bolii.

La om, transmiterea infecției se poate face, în general, pe cale aeriană (grăf, tuse, strănut etc.) sau digestivă (produse lactate), iar tuberculoza poate îmbrăca forme diverse: pulmonară, intestinală, urogenitală, osoasă, ganglionară, oculară, meningea etc.

În general, toate manifestările sunt mai mult sau mai puțin susceptibile la infecția tuberculoasă. Dintre acestea, cobaiul este extrem de sensibil atât la tipul uman, cât și la cel bovin, indiferent de calea de inoculare a bacilului tuberculos.

Pentru studii experimentale se inoculează subcutanat, pe fața internă a coapsei posterioare, o cantitate mică de cultură. După 1-2 săptămâni se constată o împănare la locul de inoculare, iar animalul devine abătut și mănâncă din ce în ce mai puțin. În continuare, împănarea evoluează spre fluctuență și se ulcerază fără nici o tendință de vindecare. În același timp, ganglionii inghinali se măresc și devin duri. Începând cu săptămâna a treia sau a patra animalul slăbește rapid, respirația se accelerează, iar temperatura crește. După 6-8 săptămâni, animalul moare. La examenele bacteriologice și anatomopatologice efectuate după autopsie se constată o infecție tuberculoasă generalizată.

Dacă unui cobai infectat (primoinfecție) i se inoculează subcutanat sau intradermic o nouă doză de germeni virulenți (reinjecție), el va reacționa cu totul deosebit în comparație cu prima infecție. La locul de reinjecție, foarte curând, după 12-24 h, se constată apariția unui edem cu aspect hemodinamic, cu evoluție rapidă spre necroză, ulcerată și vindecare, fără afectarea ganglionilor sateliți ("fenomenul lui Koch").

Prin urmare, în cursul primoinfecției, organismul devine hipersensibil și rezistent la reinjecție. Starea de hipersensibilizare, denumită și **alergie**, poate fi pusă în evidență numai prin inocularea unor produși de metabolism (difuzibili în mediul de cultură) ai bacilului tuberculos, cum este **tuberculina**. Inocularea, în general intradermică, a unei cantități foarte mici de tuberculină la un individ care prezintă o infecție tuberculoasă evolutivă sau clinic inaparentă, este urmată de apariția în scurt timp a unui eritem, edem și chiar necroză la locul de inoculare. Însoțite, uneori, și de fenomene generale, intradermoreacția (I.D.R.) fiind socotită pozitivă.

La indivizii care n-au venit niciodată în contact cu bacilul tuberculos (nu au suferit primoinfecția) nu apare nici o modificare la locul de inoculare (I.D.R. negativă).

Imunitatea. Rezistența specifică față de infecția tuberculoasă nu poate fi obținută decât cu germeni vii atenuați. Prin vaccinare, în special a copiilor, cu B.C.G. (Bacilul Calmette-Guérin), se obține o scădere importantă a cazurilor noi de tuberculoză. Acest vaccin conține bacili tuberculoși bovini care, prin treceri repetate timp de 13 ani pe mediul cu carot bilat și glicerinat, și-au pierdut virulența, dar și-au păstrat constituția chimică, proprietățile antigenice și capacitatea de a produce tuberculoză.

Tratamentul. Descoperirea unor antibiotice și chimioterapice active asupra bacilului tuberculos a modificat radical prognosticul grav al afecțiunilor tuberculoase. Dintre acestea, cele mai importante sunt: hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.), streptomicina, acidul paraminosalicilic (P.A.S.), etionamida, kanamicina, cicloserina, etambutolul, rifampicina etc. Utilizarea unor combinații de medicamente și descoperirea de noi antibiotice este necesară din cauza apariției relativ rapide și frecvente a tulpinilor de bacili tuberculoși rezistenți la antibioticele folosite în tratament.

Diagnosticul de laborator. Se bazează pe punerea în evidență a bacilului Koch în produsele patologice. În acest scop se folosesc trei metode fundamentale: examenul direct, cultivarea și inocularea la cobai.

Recoltarea produselor patologice se face în recipiente sterile cu capac ce se pot închide ermetic. În tuberculoza pulmonară, dacă bolnavul expectorează, se recoltează sputa. La bolnavul care nu expectorează, se recoltează lichidul de spălmătură laringotraheală, iar la copii, deoarece își înghit sputa, se recoltează lichidul de spălmătură gastrică și materiile fecale.

În **tuberculoza urogenitală** se recoltează urina, spermă, sânge menstrual și, eventual, produse obținute prin rachi biopsic. Pentru ca urina să fie cât mai concentrată, se recomandă ca, în ziua care precede recoltarea, bolnavul să consume cât mai puține lichide.

În **tuberculoza seroaselor** (pleurezie, peritonită, hidartroză, hidrocel) se recoltează exsudatele respective prin puncție.

În **meningita tuberculoasă** se recoltează lichid cefalorahidian prin puncție lombară sau suboccipitală.

În **tuberculoza intestinală** care, cel mai adesea, este secundară infecției pulmonare, se recoltează materii fecale.

În faza diseminării hematogene, bacilul tuberculos poate fi cultivat și în sânge.

Examenul microscopic al produselor patologice permite confirmarea diagnosticului de tuberculoză la bolnavii cu leziuni clinice evidente. El se execută direct din produs sau după omogenizare și concentrare.

Examenul microscopic direct se efectuează pe frotiuri colorate după metoda Ziehl-Nielsen. Examinarea cu obiectivul cu imersie poate pune în evidență bacili colorați în roșu strălucitor pe un fond albastru.

Când numărul germinilor în produsul patologic este redus, frotiul se face după omogenizarea și concentrarea acestuia.

Omogenizarea se face într-un balon de 250 ml, cu fund plat. Peste sputa se adaugă o cantitate egală sau de 2-3 ori mai mare, dacă produsul este vâscos, de NaOH 0,5%. Omogenizarea și fluidificarea se fac în baia de apă, la 60°, timp de 30 min.

Concentrarea prin flotare se obține prin adăugare de apă distilată până la jumătarea balonului și 2 ml neofalină sau xilol. Se agită energic 10 min, se adaugă apă distilată până la jumătarea gâtului balonului, se lasă în repaus 30 min, timp în care se formează un inel cremos în care au fost concentrați bacili tuberculoși din produs.

Stratul cremos este aspirat într-o pipetă Pasteur prevăzută cu o pară de cauciuc. Pe 2-3 lame degresate, care sunt așezate pe o platină încălzită sau pe un geam deasupra bătii, se deșină, succesiv, picături din materialul cremos (după uscarea picăturii se repetă operația) până la epuizarea acestuia. Ulterior, aceste picături multistratificate sunt degresate cu eter, fixate la flacără și colorate după metoda Ziehl-Nielsen, după care se execută examenul microscopic cu imersie.

Metoda de colorare cu auramina-rodamină B și examinarea la microscopul cu fluorescență poate da rezultate satisfăcătoare dacă se evită fluorescența nespecifică, dar pentru efectuarea acestei tehnici sunt necesare instalații speciale (surse de rare ultraviolete, trusă de filtre de absorbție).

Însămânțarea produselor pe medii de cultură. Produsele supranfectate sunt tratate prin omogenizare și decontaminare. Se recomandă însămânțarea "cu picătură". Într-o eprubetă se pun cu o pipetă Pasteur 2-3 picături purulente din spută sau din sedimentul unor produse (spută, bronhofaringiană, urină etc.) centrifugate. Se adaugă o picătură de indicator (de exemplu, albastru de bromtimol) și 10 picături de NaOH 4%. Se agită bine și se lasă 30 min la 37°C.

Neutralizarea se face cu fosfat monoacid de potasiu 15% sau cu acid clorhidric 8% care se adaugă până la obținerea unei culori galbene-verzuie. Se adaugă o picătură de penicilină din soluția de 8000 u.i./ml. Se însămânțează cel puțin 3-5 tuburi cu mediul Löwenstein-Jensen, cu câte 0,5 ml din produs. Se ard capetele dopurilor de vată și se infundă, după care tuburile sunt menținute, la 37°C, în poziție orizontală pe tăvi, timp de două zile. În continuare, tuburile sunt astupate cu dop de cauciuc sau prin parafinare și incubate în poziție verticală la 37°C, timp de două luni.

Produsele obținute prin biopsie, ca, de exemplu, fragmentele de mucoasă uterină și fragmentele de organe obținute prin autopsie (în special de la animalele inoculate experimental) sunt mojarate cu nisip de sticlă. După ce se adaugă apă distilată, se însămânțează ca atare, dacă produsul nu este contaminat cu alți germeni, sau după tratare, folosindu-se metoda centrifugării. Se iau 2 ml din produs și se pun într-un balon cu fund plat. Se adaugă o picătură de indicator și 3 ml de NaOH 4%. Se agită 5 min la agitator sau cu perle și se ține, apoi, 30 min la 37°C pentru omogenizare și distrugerea florei de contaminare. Se neutralizează cu fosfat monoacid de potasiu 15% sau cu acid clorhidric 8% până când albastrul de bromtimol virează în galben-verzuie. Centrifugarea se face la o tură de 3000 rot/min, timp de 10 min. Sedimentul se resuspendă în 2 ml apă distilată sterilă, se adaugă o picătură de penicilină (8000 u.i./ml), după care se însămânțează pe mediile de cultură.

Controlul culturilor se face timp de două luni, din două în două săptămâni. Culturile aparute sunt controlate prin frotiu colorat după metoda Ziehl-Nielsen. O atenție deosebită trebuie acordată diferențierii bacililor tuberculoși "tipici" de micobacteriile "atipice" și cele saprofite, care este posibilă prin examenul microscopic al culturilor, examenul microscopic al colonilor, momentul apariției primelor culturi, rezistența la HIN, testul catalazei etc.

Inocularea produselor patologice la animalul de laborator. Produsele care nu au suferit o suprainfecție (L.C.R., urină, exsudat pleural, peritoneal etc.) sunt inoculate ca atare sau după o prealabilă centrifugare. Produsele pluricontaminate sunt, în prealabil, debarasate de germeni asociați prin tehnici folosite la însămânțare.

Cobaiul este animalul cel mai frecvent utilizat. Se iau doi cobai de 300-350 g, care, după o carantinare de 3-4 săptămâni, sunt controlați prin I.D.R., pentru a fi eliminați cei care prezintă alergii la tuberculină.

Inocularea produsului patologic în cantitate de cel mult 1 ml se face, cel mai adesea, pe cale subcutanată, pe fața internă a coapsei posterioare. După o săptămână cobaii sunt urmăriți periodic, prin palpare, pentru depistarea apariției nodulului la locul de

inoculare și a hipertrofiei ganglionilor sateliți. Dacă se constată prezența acestora, unul din animale este sacrificat și autopsiat (nu însă înainte de 4 săptămâni).

La 5-6 săptămâni de la inoculare se controlează apariția alergiei la tuberculină prin inoculare cu 0,1 ml tuberculină brută, diluată 1/10 sau 1000 unități PPD. Reacția pozitivă se manifestă prin apariția unei infiltrații cu un diametru de cel puțin 5 mm, cu eritem. Apariția unei necroze centrale este semnalul unei reacții foarte puternice. În cazul apariției alergiei, unul dintre cobai este sacrificat imediat. Animalele rămase sau cu I.D.R. negativă sunt ținute în continuare în observație până la 3 luni, când sunt sacrificate.

În cursul autopsiei se face examenul microscopic al leziunilor de la locul de inoculare al ganglionilor și al tuturor organelor.

Din organe și, în primul rând, din splină se fac frotiuri care, după colorația Ziehl-Nielsen, sunt examinate pentru bacilii acidoalcoolorezistenți.

Când aceste examene nu sunt concludente, din organe se fac însămânțări pe medii de cultură și examene histopatologice.

Testarea sensibilității la tuberculostatice a bacilului tuberculos se face la toți bolnavii la care s-a reușit izolarea și cultivarea germinilor, atât la începutul bolii, cât și periodic în cursul tratamentului. Pentru efectuarea antibiogrammei substanțele antibiotice sau chimioterapice pot fi sau incorporate în cantități exact măsurate în mediile de cultură sau aplicate sub formă unor microcomprimare, pe tuburile cu medii însămânțate și ținute, în prealabil, două zile la 37°C în poziție orizontală. Urmărirea mediilor de cultură însămânțate se face 21 sau 28 de zile, în funcție de tehnica utilizată. O tușă este cu atât mai sensibilă cu cât este inhibată de cantități mai mici de antibiotice sau are un diametru al zonei de inhibiție cât mai mare.

Intradermoreacția la tuberculină este utilizată în diagnosticul biologic al infecției tuberculoase.

Se inoculează strict intradermic 0,1 ml din doza I (= 1 UT) sau 0,1 ml din doza II-a (= 10 UT) din PPD (tuberculină purificată) în treimea mijlocie a feței anterioare a antebrațului, dezinfectată, în prealabil, cu alcool.

Reacția se citește după 72 h și se consideră a fi pozitivă, dacă la locul injectării se constată o infiltrație cu diametrul de cel puțin 6 mm. O reacție net pozitivă arată că organismul testat a venit în contact cu bacilul tuberculos, fără a indica însă dacă în urma contactului s-a produs sau nu o tuberculoză evolutivă. O reacție intens pozitivă constituie o indicație pentru un examen clinic complet. În aprecierea unei reacții pozitive se va ține seama dacă în antecedente există o vaccinare B.C.G.

Epidemiologie. Sursa de infecție cea mai importantă este omul bolnav de tuberculoză. Laptele de vacă provenind de la animale bolnave este, de asemenea, o sursă frecventă de infecție.

În tuberculoza pulmonară, bolnavul elimină prin spută un mare număr de germeni. Contactul intim cu bolnavul al membrilor de familie, al îngrijitorilor sau al personalului medical curant facilitează transmiterea aeriană a bolii prin pulberi sau

piekturi bacilifere iar consumul de lapte contaminat poate provoca tuberculoza intestinală.

Receptivitatea la boală este generală, dar cei mai expuși la infecție sunt copiii nevaccinați și persoanele subnutrite sau cele care nu au contactat o primoinfecție.

Profilaxia specifică a tuberculozei se bazează pe depistarea activă prin control periodic microradiografic și I.D.R. la tuberculină a tuturor cazurilor incipiente de boală și tratarea acestora până la vindecarea completă, ca și pe vaccinarea obligatorie B.C.G. a tuturor copiilor.

De asemenea, se vor lua toate măsurile pentru izolarea și vindecarea prin tratamente complexe a tuturor cazurilor de boală existente, iar prevenirea bolii la contacti se va face prin chimioprofilaxie în focar.

CAP. XIX. BACILUL LEPREI (MYCOBACTERIUM LEPRAE)

Este un bacil acid-alcoolorezistent, care nu poate fi cultivat pe medii de cultură.

Lepra, boală specific umană, se poate prezenta fie sub formă nodulară sau lepromatoasă, cu leziuni în piele, mucoase și organe, fie sub formă maculoanestezică, în care granuloamele afectează traiecul unor nervi, producând paralizii, anestezii și leziuni trofice.

Bacilii leproși sunt întâlniți în granuloamele leproase, în ganglioni, în secreția nazală și în spută.

Diagnosticul de laborator se bazează pe punerea în evidență a bacilului leproș prin efectuarea unor froturi din produsele patologice și colorarea acestora prin metoda Ziehl-Neelsen.

La examinarea froturilor se constată numeroși bacili acido-alcoolorezistenți, așezați "ca țigările în pachet", extracelulari și, mai ales, intracelulari.

Testul la lepromină (o substanță similară tuberculinei) nu este la fel de specific ca I.D.R. la tuberculină.

Epidemiologie. Sursa de infecție este constituită de omul bolnav de lepră. Modul de transmitere a molii nu este bine cunoscut. Se pare că populația infantilă este cea mai susceptibilă la infecție și că perioada de incubație a bolii este foarte lungă, putând dura ani de zile.

În cadrul măsurilor profilactice se practică izolarea și tratarea bolnavilor în leprozerii. Copiii născuți în familiile de leproși sunt separați de timpuriu de aceste familii și dispensarizați.

Vaccinarea B.C.G. poate conferi un anumit grad de rezistență la infectarea cu bacilul leprei.



Fig. 21. Bacilul leprei (frotiu din produs patologic).

Cap. XX. BACILUL CĂRBUNOS (BACILLUS ANTHRACIS)

Cărbunele sau antraxul este o antroponoză (boală comună omului și animalelor) provocată de *Bacillus anthracis*.

Caractere morfologice și tinctoriale. Bacilul cărbunos este un microb în formă de bastonaș în diametru de $2\ \mu$ și lungime de $10\ \mu$, Gram-pozitiv, cu capetele lătate drept, imobil, sporulat, sporul fiind central și nu mai mare decât grosimea corpului bacterian. În corpul omului sau al animalelor bolnave, microbul apare izolat sau în lanțuri scurte și posedă, totdeauna, capsula.

Habitat. În natură, sporii constituie forma de rezistență, provenind din bacilii eliminați în mediul exterior prin excretele animalelor și ale omului bolnav și, mai ales, din cadavrele animalelor moarte de cărbune, care infectează solul, plantele și chiar alimentele. Omul se infectează accidental de la sursele citate.

Caractere de cultură. Bacilul cărbunos este un germe aerob, facultativ anaerob, care crește pe medii nutritive uzuale, geloză 2%, sau bulion la temperatura de $35-37^\circ\text{C}$; pH-ul mediilor de cultură este de $7,2-7,4$. Pe geloză 2% și pe geloză-sânge, germele se dezvoltă sub formă de colonii albe-cenusii mari, cu diametru de $2-3\ \text{mm}$, uscate, de tip "R" (rough), cu suprafața rugoasă, granulară și margini neregulate cu prelungiri laterale, sugerând aspectul unor bucle de păr sau "cap de meduză". Coloniiile rough ("R") sunt virulente, germeni posedând capacitatea de a forma capsula. Caracterul aerob al germeului este exprimat bine prin aspectul culturii în medii lichide, unde formează la suprafață o peliculă care se fragmentează și se depune la fundul tubului, formând un depozit floconos și tulburând mediul puțin sau deloc. Pe geloză-sânge, bacilul cărbunos produce colonii "R" nehemolitice, spre deosebire de alte specii saprofite, în general nepatogene ale genului *Bacillus*: *B. cereus*, *B. subtilis*, care pot produce o liză intensă a globulelor roșii în jurul coloniilor. Pe medii de cultivare, prin îmbătrânire, culturile sporilează.

Caractere biochimice și metabolice. Însămânțat în tuburi cu gelatină dreptă, germele crește și în 3-4 zile lichefiază gelatina în formă caracteristică de brad inversat. Bacilul cărbunos coagulează laptele, peptonifică cheagul (activitate proteolitică) și fermentază, fără formare de gaz, numeroase zahăruri.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Formele vegetative de bacil cărbunos sunt omorâte în 30 min la 55°C . Sporii sunt distruși la febrile în apă timp de 10 min și prin autoclavare la 120°C . Căldura uscată este mult mai puțin eficientă: la 140°C , sporii sunt distruși în 3 h. Uscăciunea și temperaturile joase (-5°C , -10°C) conservă timp îndelungat (10 ani și chiar mai mult) viabilitatea și patogenitatea sporilor. Expunerea directă la razele solare distruge sporii în 12 h. Antisepticele, ca: sublimatul corosiv soluție 1%, fenolul 5%, cloramina 5%, hidratul de sodiu 5%,

clorura de var 5%, formolul 1-2%, distrug rapid formele vegetative. Sporii sunt distruși după un contact prelungit cu antisepticele, sublimatul 2% fiind printre cele mai eficiente. Bacilul cărbunos este sensibil la acțiunea sulfamidelor și a antibioticelor (penicilină, cloramfenicol, tetraciclină, streptomycină).

Structura antigenică. Antigenul capsular al bacilului cărbunos este specific și responsabil de virulența germeului și este de natură polipeptidică. Polipeptidul glutamic capsular este puternic imunogen și responsabil de inducerea anticorpilor protectori din serul anticărbunos terapeutic preparat pe cal. Din corpul bacteriei s-a extras și un antigen somatic polizaharidic specific care nu joacă nici un rol în virulența germeului sau în efectul protector, dar este folosit în testul serologic de diagnostic.

Caractere de patogenitate. La om, forma cea mai comună de infecție provocată de *Bacillus anthracis* este cunoscută sub numele de **cărbune**, **antrax** sau **dalc**. Prezența capsulei are o acțiune antifagocitară, favorizând virulența germeului. Bacilul cărbunos își exercită însă patogenitatea și prin elaborarea unei toxine care se găsește în exsudate, în lichidul de edem din pustula malignă cărbunoasă și în mediile lichide de cultură; toxina ca și antigenul capsular joacă un rol în imunitate. Cărbunele morții prin cărbune se datorează septicemiei care provoacă blocarea capilarelor sanguine, dar și toxinei care produce starea de șoc; sângele este roșu-închis sau brun-negricios, fapt pentru care boala a luat denumirea de cărbune.

Bacillus anthracis este patogen și pentru animalele de laborator: cobai, iepure, șoarece, acesta din urmă fiind cel mai receptiv. La animale, infecția poate fi determinată prin inoculare pe cale subcutanată, intracutanată, intraperitoneală, prin inhalare sau prin ingestie. Infecțarea șoarecelui alb este folosită curent în diagnosticul de laborator al antraxului. Cărbunele este o boală cu mortalitate ridicată (80%), care afectează animalele, cel mai adesea pe cale intestinală, prin ingerarea sporilor care provin din fecale, urină sau cadavrele animalelor bolnave. La om, cărbunele apare mai frecvent la cei ce vin în contact cu animalele bolnave. Omul face forme clinice variate de infecție cărbunoasă, în raport cu poarta de pătrundere a microbului în organism. Forma cea mai frecventă este cărbunele cutanat (pustula malignă), urmată de formele de cărbune pulmonar și digestiv, ultimele două localizări fiind extrem de grave, cu letalitate foarte ridicată. Cărbunele pulmonar poate apărea la muncitorii care prelucerează perle, iană, ploi, prin inhalarea sporilor prezenți în aceste produse. Microbul se elimină prin sputa care este purulent-sanguinolentă. Cărbunele intestinală, care survine mult mai rar, apare sub forma unei enterite serosanguinolente cu prognostic grav; din materiile fecale, bacilul cărbunos este rar pus în evidență direct la microscop și este greu de izolat pe medii de cultură.

Imunitatea anticărbunoasă dobândită prin îmbolnăvire este durabilă. Starea de imunitate poate fi dobândită și prin vaccinarea cu vacinuni vii atenuate.

Tratamentul infecției cărbunoase se face cu antibiotice, sulfamide, ser anticărbunos, iar în cazurile grave acestea se administrează asociat.

Diagnosticul de laborator. Produsele patologice ce trebuie preluate în vederea diagnosticului de laborator al antraxului sunt: serozitatea sau secreția

purulent-sanguinolentă din veziculele pustulei maligne sau din lichidul de edem al testului celular subcutanat, sîngele în formele septice de antrax, secreții sau exsudate fibrinoase faringoamigdalice din cărbunele faringian care simulează adesea false membrane din difterie, lichidul cefalorahidian cu aspect caracteristic hemoragic de la cazurile de meningocelafită cărbunoasă, sputa, de asemenea, cu caracter hemoragic de la bolnavii cu cărbune pulmonar, fecalele în formele de cărbune intestinal, fragmente de tesuturi și organe (piele, splină, ficat, pîr, vase), de la cadavrele oamenilor sau ale animalelor moarte de cărbune.

În sânge și L.C.R., germeni patogeni se află în cultură pură, hemocultura se face prin însămînțarea a 10-15 ml sânge recoltat aseptice din venele plicii cotului în 150-200 ml bulion, din care după 24 h de incubare la temperatură se fac treceri pe geloză. L.C.R., scos prin puncție lombară aseptice, este însămînțat ca atare într-un tub cu bulion și, prin dispersii, pe plăci Petri cu geloză 2% și geloză-sânge (5 ml-8 ml %).

Recoltarea serozităților sau a lichidului de edem se face în mod aseptice, cu o pipetă Pasteur fin efiată, cu care se puncționează veziculele pustuloase; se fac frotiuri colorate Gram, Giemsa și cu albastru Loeffler. În paralel se fac dispersii pe geloză 20% și dispersii pe geloză-sânge, iar din veziculele nerupte se face o însămînțare pe bulion. Când este posibil, se fac și inoculări subcutanate sau intraperitoneale la șoarece. Pe frotiurile colorate Gram se observă bacili Gram-pozitivi capsulați, cu capetele tăiate drept și rare leucocite polimorfonucleare. Pe frotiurile colorate cu Giemsa se văd clar leucocitele; atât pe frotiurile Giemsa, cât și pe cele colorate cu albastru Loeffler, capsula este bine pusă în evidență, fiind colorată în roz. Pe plăcile cu geloză apar coloni caracteristice de tip "R" relativ mari după 24 h, uscate, cu margini neregulate și cu prelungiri laterale, caracteristice, cu aspect de "cap de meduză", care pot fi văzute la microscop cu obiectivele uscate sau cu lupa.

Pe geloză-sânge bacilul cărbunos dă aceleași coloni tipice care sunt nehemolitice, ceea ce îl diferențiază de bacili saprofiti. În bulion germeul formează pelicula la suprafață, iar preparatul proaspăt între lamă și lamelă arată lipsa de mobilitate, pozitivă la bacili saprofiti, aerobi, Gram-pozitivi. Frotiurile din culturi pe medii solide sau în bulion arată bacili cu caracterile menționate mai sus.

Secrețiile din furunculul antracoid abcedat sau din cărbunele faringian sunt recoltate pe timpuri. Însămînțarea se face numai pe medii solide. Din coloniile caracteristice se fac frotiuri Gram și treceri în bulion pentru studiul mobilității. Nu se va omite inocularea s.c. la șoarece.

În același mod se va proceda și cu sputa.

Fecalele au aspect hemoragic; germeul poate fi, uneori, observat pe frotiu direct. În mod obișnuit se fac însămînțări pe medii de cultură și se prepară o emulsie de fecale care se inoculează s.c. la șoarece.

Produsele cu floră bogată de asociație, în special fecalele și chiar sputa, secrețiile faringoamigdalice, cele din antraxul cutanat supurat, dar mai ales fragmente de ficat, splină, piele, recoltate de la cadavru sunt supuse testului de termorezistență a sporilor

prin fierbere 3-5 min în apă clocotindă sau prin încălzire 10 min la 60-70°C la baie de apă, după care se fac inocularea la șoarece și însămînțări pe medii solide și în bulion.

Trebuie accentuat că toate felurile de produse de la om sau animal sunt inoculate subcutanat (aproximativ 0,5-1 ml produs), în regiunea dorsală sau pe flancuri la șoarece. Acest animal, fiind foarte sensibil la antrax, moare după 2-3 zile cu septicemie cărbunoasă. Se face autopsia animalului, se prelevă aseptice fragmente de splină și ficat care sunt însămînțate în bulion și cu care se fac amprente. Acestea se colorează 10 min cu albastru Loeffler. Pe frotiu se observă celulele parenchimului splenic sau hepatic și numeroși bacili cărbunoși, uneori chiar sporulați, dar întotdeauna înconjurați de capsulă colorată în roz-ciclamă, ceea ce face ca singur acest frotiu să constituie un diagnostic de certitudine. De la șoarece, prin puncție cardiacă aseptice, se mai poate face hemocultură în bulion și pe medii solide, obținându-se culturi de bacili cărbunoși cu aspectele caracteristice descrise.

Diagnosticul serologic (testul termoprecipitării Ascoli) se practică pentru stabilirea unui diagnostic retrospectiv rapid la cadavre intrate în putrefacție, atunci când culturile au rămas negative.

Peste câteva grame de tesut sau organe tăiate mărunt se adaugă un volum de 5 ori mai mare de soluție salină fiziologică. Se fierb 2-10 min în funcție de cantitatea de organ. Prin fierbere se precipită proteinele și se extrage polizaharidul specific somatic, termostabil, care este filtrat prin hârtie de filtru. Cu pipeta Pasteur se introduce 0,5-1 ml extract într-un tub de precipitare peste care se adaugă cu atenție, tot cu pipeta Pasteur, ser precipitant anticărbunos care, fiind mai greu, este lăsat să curgă încet, la fundul tubului. Reacția este pozitivă când la limita de separație dintre cele două lichide, în 3-5 min, apare un inel alb de precipitat.

Epidemiologie. Antraxul este o zoonoză pe care o înămin și la om în mod accidental. Izvorul de infecție pentru om este reprezentat de animalele bolnave și cadavrele lor. Omul se infectează în cursul îngrijirii animalului bolnav, a sacrificării acestuia, sau, mai rar, prin consumul de carne infectată. Muncitorii care prelucerează blănurile pot contracta antrax pulmonar prin inhalarea de pulberi contaminate. Recepțivitatea populației la boală este generală, iar boala dă o imunitate durabilă.

Pentru prevenirea bolii trebuie interzis consumul de carne necrotoată de organele sanitare, iar cadavrele animalelor moarte de antrax vor fi incinerate sau, la nevoie, îngropate la o adâncime de 2 m și acoperite cu var nestins. De asemenea, se vor lua toate măsurile de protecție a muncii în sectorul zootehnic sau la întreprinderile de prelucrare a blănurilor, pieților, lânii etc. O atenție specială va fi acordată măsurilor sanitare veterinare de depistare și tratament a animalelor bolnave, precum și de supraveghere și vaccinare anticărbunoasă a celor expuse riscului infecției.

CAP. XXI. BACTERII ANAEROBE

1. CARACTERE GENERALE

Bacteriile anaerobe sunt germeni care se dezvoltă numai în absența sau în prezența unei cantități foarte mici de oxigen. Dintre numeroasele specii de acest gen, numai câteva prezintă importanță pentru patologia umană. Ele pot fi grupate astfel:

- Specii care se găsesc în mod obișnuit în *cavitățile naturale ale omului și ale animalelor* (streptococi și stafilococi anaerobi etc.) și care nu formează spori, nu produc toxine, dar pot genera *îmbolnăviri grave*.
- Specii care se întâlnesc, în general, în *pământ*, formează spori și elaborează *toxine foarte puternice*. Dintre acestea se menționează bacilul tetanic, bacilul botulinic și germeni gangrenei gazoase.

Pentru izolarea și cultivarea microorganismelor anaerobe sunt necesare metode și tehnici speciale care să permită înlăturarea oxigenului din mediile de cultură și menținerea anaerobiozei pe durata examenului. Îndepărtarea oxigenului din mediele de cultură poate fi realizată prin metode fizice, chimice și biologice.

Metode fizice:

- înlăturarea oxigenului din mediu prin fierbere și răcire bruscă;
- introducerea recipientelor cu medii într-un exicator din care se scoate aerul cu o pompă de vid. În locul aerului scos se poate introduce azot sau alt gaz inert, fără oxigen.

Metode chimice:

- introducerea în exicatorul în care sunt păstrate mediile de cultură, a unui amestec reductor (de exemplu, pirogalol + NaOH);
- incorporarea unor substanțe reductoare (glucoză, cistină, acid ascorbic etc.) netoxice, în mediile de cultură.

Metode biologice:

- cultivarea germinilor anaerobi în prezența unor germeni puternic aerobi care consumă oxigenul;
- adăugarea la mediile de cultură a unor fragmente de organe animale sau de țesuturi vegetale care absorb oxigenul.

Menținerea anaerobiozei se realizează fie prin adăugarea la suprafața mediilor de cultură a unui strat de ulei de parafină steril, fie prin folosirea unor tuburi subțiri cu o coloană înaltă de mediu ce limitează foarte mult suprafața de contact cu aerul, fie prin alte metode.

Cele mai importante boli produse de germeni anaerobi sunt tetanosul și gangrena gazoasă care, în general, sunt complicații ale plăgilor, precum și botulismul, care este o intoxicație alimentară.

2. BACILUL TETANIC (CLOSTRIDIUM TETANI)

Produce **toxinfecția tetanică**. Bacilul tetanic se prezintă sub forma unui bastonaș, este *Gram-pozitiv* și, atunci când este sporulat, are la unul din capetele sale un *spor rotund* ce depășește grosimea bacteriei. Crește numai în medii anaerobe, degajând un miros caracteristic de corn ars. În cursul infecției rămâne cantonat la poarta de intrare – în plagă – și elaborează toxina care trece în organism, intoxica sistemul nervos și produce boala. Tetanosul dă o mortalitate mare.

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea și identificarea bacilului tetanic sunt dificile. Se recoltează *tesuturi* sau *puroi* din plăgi, porțiuni din *cordoanel ombilical* la nou-născuți, *pansamente* etc.

Însămânțarea se face în *bulion*, *geloză moale* etc., iar incubarea în *anaerobioză*. Identificarea bacilului tetanic izolat poate fi obținută prin *inoculare* subcutanată la *șoarece* a culturii în bulion. Animalul va prezenta semne de intoxicație nervoasă: paralizii și contracturi locale care se generalizează, ducând la moarte.

Din toxina tetanică, prin detoxifiere, se prepară *anatoxina tetanică*. Acesta este, de fapt, vaccinul antitetanic, larg utilizat în profilaxia bolii. Vaccinarea antitetanică are ca efect scăderea foarte accentuată a cazurilor de tetanos. În caz de îmbolnăvire se administrează ca tratament specific *ser antitetanic*, care contribuie la detoxifierea rapidă a organismului și, prin aceasta, la salvarea bolnavului. Serul antitetanic se administrează și profilactic, concomitent cu vaccinarea antitetanică, la persoanele neimunizate anterior, care prezintă plăgi deschise murdare cu pământ.

Epidemiologie. Tetanosul nu este o boală contagioasă decât în condiții favorizante speciale. Sporii bacilului tetanic se găsesc în mod normal în intestinul omului și al animalelor sănătoase, de unde sunt eliminați prin fecale în mediul extern. Ei sunt răspândiți peste tot în sol, mai ales în terenurile îngrașate cu bălgăr. Cu toate acestea, boala este rară atât la om, cât și la animale, deoarece chiar atunci când pătrund în plagă sporii bacilului tetanic au nevroze de condiții speciale de anaerobioză pentru a trece în forma vegetativă, pentru a se multiplica și a produce exotoxina tetanică ce produce boala.

Tetanosul se produce prin implantarea și dezvoltarea sporilor în plăgi traumatice, chirurgicale, plăgi uterine după avort sau după naștere, plăgi ombilicale la nou-născut. Recepțivitatea omului la bacilul tetanic este relativ mică, dar sensibilitatea sa la exotoxina acestuia este mare.

Prevenirea tetanosului se poate face prin curățirea, spălarea și aseptizarea plăgilor traumatice, asistență medicală calificată la naștere etc. Profilaxia specifică se face prin vaccinare cu anatoxina tetanică, iar tratamentul bolii include, pe lângă asanarea chirurgicală a plăgilor tetanice, și tratament medicamentos, inclusiv antibiotice și administrarea de ser antitetanic sau, de preferat, imunoglobulină tetanică umană.

3. BACILII GANGRENEI GAZOASE

Gangrena gazoasă este o toxinfecție gravă produsă de o *asociație de germeni*

CAP. XXII. SPIROCHETELE (FAMILIA SPIROCHETACEAE)

Din această familie fac parte trei germeni cu importanță medicală: genul *Treponema*, genul *Leptospira* și genul *Borrelia*.

1. GENUL TREPONEMA

Specia reprezentativă a acestui gen este *Treponema pallidum*, agentul etiologic al sifilisului. Germenul se găsește, la omul bolnav, în șancrul primar, gomele sifilitice, ganglionii limfatici, pereții vaselor cerebrale, aortei etc. De asemenea, se întâlnește în placenta mamei sifilitice sau în organele fătului sifilitic, mai ales în ficat.

Caractere morfologice și tinctoriale. *Treponemele* sunt germeni spiralați, care prezintă mișcări de rotație, de flexiune și de translație.

Pentru a le pune în evidență sunt necesare tehnici de examinare sau colorații speciale. Astfel, pentru examinarea preparatelor proaspete se folosește procedeul de examinare pe fond întunecat, iar frotiturile trebuie colorate după metoda impregnăției argintice sau după metoda Giemsa.

Cultivarea treponemelor pe medii artificiale este foarte dificilă.

Rezistența la agenți chimici și biologici. *Treponemele* sunt foarte sensibile la căldură, la substanțe antiseptice, la *soluțiile arsenicale și mercuriale*, precum și la unele *antibiotice*, dintre care penicilina trebuie menționată în primul rând.

Boala la om. Transmiterea bolii se face aproape exclusiv prin contactul sexual (boala venetică).

După infectare, la 10-40 de zile (în medie 3 săptămâni), apare *șancrul de inoculare* (o leziune inflamatorie ulcerată), urmat de prinderea ganglionilor sateliți și răspândirea infecției în tot organismul. Uneori, acest șancru poate lipsi. Șancrul de inoculare se vindecă și fără tratament, dar infecția își continuă cursul – trecând în faza secundară, caracterizată prin apariția unor *lezioni cutanate* (rozeole sifilitice) și ale *mucoselor*. Și aceste leziuni dispar fără tratament, dar, după câteva luni, apar *gomele sifilitice* (sifilisul terțiar) și, ulterior, după ani de zile, apar semnele *sifilisului nervos*.

Imunitate. Omul vindecat de sifilis capătă o rezistență destul de marcată față de *Treponema pallidum*, dar nu definitivă. În serul bolnavilor de sifilis pot fi puși în evidență anticorpi.

Tratamentul sifilisului se poate face cu ajutorul unor substanțe chimice complexe care cuprind: arsen, bismut, mercur etc. În prezent, s-a renunțat, în parte, la aceste medicamente care pot da naștere la accidente și se utilizează pe scară largă și cu mult succes penicilina. *Treponema pallidum* este, de asemenea, sensibilă la aureomicină și cloramfenicol.

Diagnosticul de laborator al sifilisului comportă punerea în evidență a *Treponemei pallidum* în *produsele patologice* recoltate de la bolnav (diagnosticul bacteriologic) sau a modificărilor produse de acest agent patogen în *serul bolnavului* respectiv (diagnosticul serologic).

Diagnosticul bacteriologic. *Treponema pallidum* poate fi pusă în evidență în leziunile sifilitice.

- **Examenul preparatelor proaspete** pe fond întunecat se practică în cazul existenței șancrului, a afecțiunilor din perioada secundară, a leziunilor cutanate și mucoase etc. Trebuie să se aibă în vedere că la suprafața tegumentelor pot exista leziunea cu vată sterilă îmbibată în ser fiziologic sau în apă fiartă, după care se recoltează, cu ajutorul unei pipete Pasteur, serozitatea roz care iese la presiune, la marginea leziunii.

În cazul leziunilor secundare, se șterge energic leziunea și se recoltează secreția seroasă care se formează.

Serozitatea recoltată din șancru, leziuni secundare etc. este examinată direct la microscop pe fond întunecat sau pe frotiuri colorate.

Examenul microscopic pe fond întunecat se execută la un microscop obișnuit, echipat cu sursă de lumină puternică și cu un condensator special cardiod sau paraboloid; acesta realizează fondul negru. O parte din razele luminoase, care vin din partea laterală sunt reflectate de către microorganism, astfel că ele apar clar conturate pe fondul întunecat al câmpului microscopic. *Treponemele* prezintă mișcări de rotație axială însoțite de mișcări ondulatorii.

- **Examinarea treponemelor pe frotiuri colorate:** colorație prin impregnare argentică (metoda Fontana-Tribondeau); prin această metodă, *treponemele* apar colorate în negru-brun, iar restul frotiului în galben.

Diagnosticul serologic al sifilisului se bazează pe o serie de reacții, dintre care cele mai cunoscute sunt *reacția de floclulare V.D.R.L.* și *reacția de fixare a complementului Bordet-Wassermann*.

Reacția V.D.R.L. (Venereal Disease Research Laboratory)

Antigenul cardiopalinic tip VDRL pentru diagnosticul sifilisului este livrat de Institutul Cantacuzino într-o trusă conținând:

- o fiolă cu 5 ml antigen;
- un flacon gol de 10 ml din sticlă brună neutră pentru transvazarea antigenului din fiolă;
- o fiolă conținând 10 ml sol. salină tamponată stock (x10). Se diluează de 10 ori în apă distilată pentru folosire.

Trusa nedesfăcută se păstrează la întuneric și temperatura camerei (18° - 25 °C).

Tehnica microreacției

1. Materiale

- placă cu godeuri cu diametru de 15 mm.
- seringă de 1-2 ml.
- ac de seringă special calibrat (1 pic = 1/60 ml).
- pipete de 1 și 5 ml.

- flacoane de 25 ml, cu dop de sticlă rodat.
- sticle de ceas cu diametrul de 8 mm.
- lupă puternică (preferabil binoculară de masă, sau microscop 80 x - 100 x)
- agitator rotativ (facultativ)

2. Prepararea antigenului

Temperatura tamponului salin atunci când se prepară antigenul, va trebui să fie de 23-29°C.

1. Se iau 0,4 ml tampon într-un flacon cu dop de sticlă rodat, având o capacitate de 25 ml.

2. Se adaugă 0,5 ml antigen cu o pipetă perfect curată și uscată. Antigenul se adaugă direct în tampon în timp ce se rotează sticla (continuu dar ușor) pe o suprafață netedă. Antigenul se adaugă rapid picătură cu picătură, durata operației trebuie să fie aproximativ de 6 secunde.

3. Se suflă ultima picătură de antigen din pipetă fără a se ajunge cu pipeta la tampon.

4. Se continuă rotirea sticlei timp de 10 secunde.

5. Se adaugă 4,1 ml tampon. Se astupă sticla și se amestecă suspensia antigenică, întorcând sticla în sus și în jos aproximativ de 30 ori, timp de 10 secunde.

6. Suspensia de antigen este gata și se poate folosi în tot cursul zilei.

7. Ori de câte ori este folosit antigenul, se amestecă ușor prin rotire și nu cu ajutorul seringii prin aspirare și respingere pentru a se evita o scădere a reactivității.

Pregătirea serurilor. Se centrifugează pentru clarificare; inactivare 30 min la 56°C. Dacă au trecut 4 ore de la inactivare se încălzesc 10 min la 56°C înainte de lucru.

Tehnica propriu-zisă

Se recomandă ca temperatura de lucru a camerei să fie de 23-29°C deoarece variațiile de temperatură, sub sau peste aceste limite, influențează în mod evident reactivitatea.

1. Se pun 0,05 ml ser inactivat în godeul plăcii.

2. Se adaugă o picătură de antigen (1/60 ml) peste fiecare ser. Se recomandă ca să se pună suspensia antigenică pentru lucru într-o sticlă de ceas pentru a o manipula mai ușor.

3. Se rotează placa timp de 4 minute (de preferat la un agitator rotativ cu 180 rotații pe minut). În cazul că această rotire se execută manual, diametrul de rotație va fi de 4-5 cm, cu același număr de rotații pe minut, efectuate pe o suprafață plană; placa va fi protejată de zgărieturi, fixându-se pe fondul ei o hârtie, în timpul rotații.

4. **Aprecierea rezultatelor.** Rezultatul negativ: slabă turbiditate a lichidului, nu se observă flocoane.

Rezultat slab pozitiv (+): flocoane mici, în lichid parțial clar.

Rezultat pozitiv mediu (++): flocoane evidente.

Rezultat pozitiv (+++ +++++): flocoane mari în lichid clar.

Reacțiile dubioase trebuie interpretate ca negative sau se repetă.

Rezultatul trebuie citit imediat după efectuarea reacției, cu ajutorul unei lupe puternice (preferabil lupă de masă sau microscop 30 x - 100 x).

După trecerea a câteva minute, în toate serurile apare un precipitat care împiedică eventualitatea se recomandă a nu se executa mai mult de 20 reacții deodată.

Atunci când se bănuiește posibilitatea unui fenomen de prozonă (rezultat fals negativ determinat de inhibiția totală sau parțială a reactivității prin exces de anticorp) se fac testări cantitative.

Reacția de fixare a complementului Bordet-Wassermann

Se utilizează în diagnosticul tuturor formelor clinice de sifilis și în controlul eficacității tratamentului.

Principiul reacției de fixare a complementului (R.F.C.). R.F.C. este un test de diagnostic serologic care permite punerea în evidență "in vitro" a reacției antigen-anticorp. Ea se bazează pe proprietatea complementului de a se fixa numai pe imunocomplexele antigen-anticorp.

Reactivi:

1. **Sistemul hemolitic.** Sângele de berbec defibrinat este "spălat" cu o soluție fiziologică 0,85%, de trei ori prin centrifugare, câte 10 minute, la 2500 turații/min. Pentru prepararea a 100 ml sistem hemolitic se folosesc 1,5 ml depozit de hematii, ser hemolitic într-o concentrație de 4 ori mai mare decât cea stabilită prin titrare și ser fiziologic până la volumul total de 100 ml.

În practică, serul fiziologic se împarte mai întâi în două părți aproximativ egale, la una dintre acestea adăugându-se hematiile, iar la cealaltă serul hemolitic.

Sensibilizarea se face prin amestecarea bruscă a celor două soluții urmată de transvazări repetate rapid, dintr-un recipient în altul. După aceasta, balonul conținând sistemul hemolitic se va păstra 30 minute la termostaț.

2. **Complementul** este reprezentat de un amestec de seruri de cobai. Indiferent dacă acesta este proaspăt sau conservat, se va titra în ziua executării reacției, după următoarea schemă:

Complement diluat 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	-
Ser fiziologic	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,50 ml
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1 ml

Rezultatul se citește după o incubare de 10 minute la baie de 37°C. În reacție se va întrebuința jumătate (deoarece reacția de bază se execută cu jumătăți de cantități) din cantitatea imediat superioară celei care a produs hemoliza completă.

3. **Antigenul cardiolipinic** este o soluție alcoolică de cardiolipină, lecitină și colesterol.

Emulsia antigenică se prepară din antigenul cardiolipinic diluat în soluție fiziologică 1/120.

Diluarea se face turnându-se încet antigenul, picătură cu picătură, în soluția salină și agitându-se energic. După 10 minute de repaus pe masă, soluția este utilizabilă.

4. *Serul de bolnav*, ca și serurile de control sunt inactivate în dimineața zilei în care se practică reacția.

Reacția de bază poate fi efectuată calitativ (numai cu ser de cercetat nediluat) sau cantitativ (cu diluții de ser).

Metoda calitativă se execută după următoarea schemă:

Tub nr.	Ser de cercetat fiziologic	Antigen cardio-lipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complement conf. titrat în 0,20 ml	Agitare 45' la baie 37°C	Sist. hemol.	Agitare, apoi 15' la baie 37°C
1.	0,10	0,20	0,25	"	0,20	"	0,50
2.	0,15	0,40	—	"	0,20	"	0,50
3.	—	0,30	0,25	"	0,20	"	0,50
4.	—	0,55	—	"	0,20	"	0,50
5.	—	0,75	—	"	—	"	0,50

La fiecare serie de seruri de cercetat se folosesc controale pozitive și negative. Examenul lichidului cefalorahidian (LCR) se execută după o schemă similară:

Tub nr.	LCR în 0,5 ml fiziologic	Ser cardio-lipinic diluat 1/20	10' la temp. camerei	Complement conf. titrat în 0,20 ml	Agitare 45' la baie 37°C	Sist. hemol.	Agitare, apoi 15' la baie 37°C
1.	0,50	—	0,25	"	0,20	"	0,50
2.	0,25	—	0,25	"	0,20	"	0,50
3.	0,5	—	—	"	0,20	"	0,50
4.	—	0,50	0,25	"	0,20	"	0,50
5.	—	0,70	0,25	"	0,20	"	0,50
6.	—	0,95	—	"	—	"	0,50

Pentru evaluarea mai corectă a rezultatului se va recomanda un examen cantitativ cu diluții de L.C.R. până la 1,32. Nu este necesar ca lichidul să fie inactivat, în afară

de cazul că este amestecat cu sânge. În acest caz, de asemenea, este necesar să se îndepărteze hematiile.

Interpretarea rezultatelor:

- hemoliză totală = negativ (-)
- hemoliză incompletă = dubios (+)
- lipsă hemoliză = de la slab pozitiv (+) la intens pozitiv (+++).

Epidemiologie. Sifilisul este o boală venereală, având ca izvor de infecție omul bolnav. Transmiterea se face, de regulă, prin *raport sexual* și numai cu totul excepțional prin lenjerie, veselă utilizată în comun etc. Contagiozitatea maximă este în perioada primară și secundară. Treponemele se pot elimina și prin lapte, urină, spermă, dar în număr foarte redus.

Profilaxia. Depistarea cât mai precoce a bolnavilor de sifilis este una din măsurile de bază în prevenirea și combaterea acestei boli.

Dintre metodele de depistare activă, cele mai utilizate sunt **examenul serologic**. Acestea sunt **obligatorii** și se efectuează la controlul periodic antivenerean al personalului din sectorul alimentar și alte servicii publice (hoteliuri, băi, frizerii), la angajarea în serviciu, la intrarea în școli și facultăți, la gravide, la eliberarea certificatului prenatal etc.

Anchora epidemiologică este însă cea mai importantă metodă de depistare activă. Ea permite descoperirea bolnavilor neînregistrați și netraiați, care contribuie cel mai mult la răspândirea bolii.

2. GENUL LEPTOSPIRA

Leptospirozele sunt **microorganisme spiralate**, patogene pentru om și pentru animal. Datorită unei structuri antigenice stabile și diferențiate, leptospirozele sunt clasificate pe această bază și identificate, mai ales prin metode imunologice.

Bolile provocate de leptospire poartă numele de **leptospiroze**.

Leptospirozele sunt întâlnite în natură mai ales în apele râurilor, în piscine, lacuri etc. Ele pot fi, de asemenea, găsite la rozătoarele sălbatice și animalele domestice. Leptospirozele se localizează, mai ales, în rinichi, de unde se elimină prin urină în mediul exterior și infectează apa și unele alimente prin intermediul cărora pot îmbolnăvi omul.

Caractere morfologice și tinctoriale. În preparatele proaspete, leptospirozele nu pot fi văzute decât la microscopul pe fond întunecat. Ele pot fi însă ușor de examinat la microscopul obținut, dacă sunt supuse unor colorații speciale.

Leptospirozele colorate Giemsa se prezintă sub forma unor filamente fine, ondulate, colorate în violet, cu capetele curbate în C sau S.

Împregnarea argentică a leptospirozelor prin metoda Fontana-Tribondeau este procedeu cel mai frecvent utilizat. În urma acestei colorații, leptospirozele apar negre, ondulate, îngroșate din cauza împregnării argentice și la care spițele nu mai sunt evidente.

CAP. XXV. VIRUSOLOGIE GENERALĂ

1. DEFINIȚIE

Virusologia sau **inframicrobiologia** este știința care se ocupă cu studiul **virusurilor** sau al **inframicrobilor** și cu afecțiunile provocate de aceștia.

În urmă cu 100 ani, în anul 1892, Ivanovski a descoperit primul virus, agentul cauzal al mozaicului tutunului. În următoarele decenii au fost descoperite numeroase alte virusuri care provoacă importante îmbolnăviri la om cum sunt: variola, raba, poliomielite, hepatita virală, gripa etc. În ultimii ani a fost descoperit un nou agent viral care produce SIDA.

Virusurile constituie un regn aparte, VIRA, microorganisme lipsite de organizare celulară și care se deosebesc fundamental de organismele eucariote sau procariote.

2. CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Virusurile sau **inframicrobii** sunt germeni extrem de mici, foarte puțin evoluți, situați pe primele trepte ale vieții. Aceste forme primitive de viață au o organizare uđ.mentară, incompletă, astfel că nu-și pot realiza un metabolism propriu, multiplicarea lor fiind legată de **parazitarea obligatorie a celulelor vii**.

Virusurile au următoarele particularități:

- Sunt particule de dimensiuni foarte mici (10 - 300 mμ). Pentru acest motiv, în marea lor majoritate, nu pot fi puse în evidență decât cu ajutorul microscopului electronic.
- Posedă un singur tip de acid nucleic (ADN sau ARN).
- Sunt filtrabile și ultrafiltrabile. Pe baza acestui caracter virusurile pot fi separate de bacterii.
- Sunt paraziți intracelulari obligatorii. Virusurile nu pot fi cultivate pe medii de cultură folosite în mod obișnuit în bacteriologie.
- Înmulțirea virusurilor se face prin replicare.
- Sunt specifice; fiecare virus provoacă o anumită boală.
- Produc incluzii în celulele parazitate. Prezența acestor incluzii nucleare, citoplasmice, sau concomitenți în nucleu și citoplasmă, în anumite țesuturi, ușurează diagnosticul de laborator al unor viroze deoarece sunt caracteristice.
- Fiecare virus prezintă o structură antigenică specifică. Omul și animalele infectate

cu un anumit virus produc anticorpi specifici iar imunitatea dobândită este solidă și de lungă durată. Tehnicile de serologie utilizate în diagnosticul de laborator al virozelor detectează acești anticorpi.

- Virusurile sunt, în general, insensibile la antibioticele uzuale și la unele substanțe chimice care distrug bacteriile.

3. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ȘI A VIROZELOR

Pentru definirea principalelor familii, genuri și specii de virusuri trebuie să se țină seama de mai multe criterii: acidul nucleic din genomul viral (ADN sau ARN), mărimea particulei virale, prezența sau absența învelișului viral, numărul de capsomere, comportamentul față de anumiți agenți chimici și în primul rând față de eter, afinitatea pentru o anumită gazdă, organ sau aparat anatomic, aspectul clinic al bolii etc.

În interiorul fiecărui grup (gen) subclasificarea speciilor se bazează pe diferențe antigenice care permit identificarea a numeroase tipuri.

În funcție de **gazda parazitată** virusurile pot fi patogene pentru anumite animale vertebrate sau nevertebrate, virusuri patogene pentru plante sau virusuri patogene pentru bacterii (bacteriofagi).

Virusurile patogene pentru om și eventual și pentru unele animale sunt obiectul de studiu al **virusologiei medicale**.

Dintre familiile de virusuri animale grupate în funcție de compoziția genomului menționăm câteva care produc viroze umane:

- **virusuri ADN**: Papovavirus (negi), Adenovirus (adenoviroze), Herpesvirus (herpes și zona zoster), Poxvirus (variola și vaccinia).
- **virusuri ARN**: Picornavirus (poliomielite, enteroviroze etc.), Togavirus (arbovirozele), Arenavirus (choriomeningita limfocitară, febrele hemoragice sudamericane etc.), Coronavirus (infecții respiratorii), Orthomixovirusuri (gripa), Retrovirusuri (SIDA) etc.

După aspectul clinic al bolii, virozele se pot încadra în două mari categorii:

Infecții virotice generalizate. În cursul acestor îmbolnăviri, virusul se răspândește pe cale sanguină în tot organismul și poate determina erupții caracteristice pe piele și mucoase. În acest grup sunt cuprinse: variola, rujeola, ruzeola, varicela.

Infecții cu localizare primară în anumite organe pentru care virusul respectiv are afinitate. Răspândirea virusurilor se face pe cale sanguină, pe calea nervilor periferici sau pe amândouă căile. Din acest grup fac parte:

- infecții ale sistemului nervos central: poliomielite, turbarea;
- infecții ale aparatului respirator: gripa, guturaiul;
- infecții localizate pe piele și mucoase: herpesul, negii, zona zoster;
- infecții ale ficatului: hepatita epidemică;
- infecții ale glandelor salivare: parotidita epidemică;
- infecții ale ganglionilor limfatici: limfogranulomatoza veneriană.

Aceste modificări de pH sunt ușor constatate datorită indicatorului din mediul de cultură.

Apariția efectelor de mai sus indică prezența unui virus în culturile inoculate. Este necesar însă să se precizeze natura acestui virus.

Identificarea virusurilor pe culturi de celule se face cu ajutorul serurilor de referință. Aceste seruri specifice se prepară în mod curent pe iepuri și cobai.

Tipizarea virusurilor pe culturi de celule este posibilă dacă se pune în contact, un anumit timp, virusul izolat din produsul patologic cu diferite seruri de referință care conțin anticorpi cunoscuți. Acest amestec este apoi inoculat pe o cultură de celule.

Concomitenți, alte tuburi cu culturi celulare sunt inoculate numai cu virus constituind martorul.

Ulterior toate tuburile sunt examinate zilnic la microscop. Absența efectului citopatic la tuburile inoculate cu virus + ser de referință, conjugată cu prezența acestui efect la martor, arată că există un fenomen de neutralizare specifică de tip antigen-anticorp, identitatea virusului fiind dată de serul de referință care l-a neutralizat.

Punerea în evidență a anticorpilor antivirali dintr-un ser este relativ ușoară și se realizează prin punerea în contact a serului de cercetat cu diverse tulpini de virus de referință. Inocularea ulterioară a amestecului în culturi celulare și examinarea zilnică a acestor culturi indică, în cazul neutralizării, prezența în aer a anticorpilor neutralizanți corespunzători virusului de referință.

6. ACȚIUNEA UNOR AGENȚI FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA VIRUSURILOR

În general, în afara organismului, în condițiile obișnuite ale mediului ambiant, majoritatea virusurilor sunt inactivate în câteva ore.

Variațiile de temperatură. Căldura are o acțiune nefavorabilă asupra virusurilor. Marea lor majoritate sunt inactivate la 60°C în decurs de 30 min. Există însă și virusuri mai rezistente, cum este cel al hepatitei prin ser omolog, fapt ce impune o sterilizare corectă a seringilor utilizate în clinica umană pentru a evita transmiterea bolii de la omul bolnav sau purtător la alți indivizi.

Temperatura scăzută are o acțiune de conservare asupra virusurilor: congelarea la -20°C și mai ales la -70°C conservă aceste microorganisme luni și chiar ani de zile.

Virusurile nu posedă forme de rezistență similare sporilor de la bacterii.

Uscarea rapidă poate conserva virulența virusurilor. Când uscarea se face lent se produce de obicei o atenuare a patogenității acestora.

Radițiile ultraviolete au o acțiune nocivă asupra virusurilor. Prin acest procedeu se practică sterilizarea boxelor în care se lucrează cu infamicrobi.

Când expunerea virusurilor la radițiile ultraviolete este de scurtă durată, se poate produce o atenuare a virulenței acestora, putându-se obține vaccinuri cu o bună imunogenitate.

Radițiile infraroșii nu par să aibă vreo acțiune asupra virusurilor.

Ultrasonetele inactivează unele virusuri cum sunt: virusul vaccinal al turbării, poliomielitei etc.

Variațiile de pH. pH-ul optim pentru conservarea virusurilor este 7,2. În general virusurile rezistă la pH-ul situat între 5 și 9. Aciditatea sau alcalinitatea care depășește aceste limite inactivează și alterează compusulii virali.

Glicerina are o acțiune de distrugere a bacteriilor și a unor virusuri (psitacoza, ornitoză). Totuși majoritatea virusurilor (poliomielite, rabie, vaccinal etc.) pot fi păstrate în soluție de glicerină 50% timp de mai mulți ani. În cursul conservării, patogenitatea virusurilor diminuează, dar capacitatea antigenică se păstrează.

Eterul inactivează și distruge virusurile care au în constituția lor lipide (gripal, herpetic etc.) pe care le dizolvă. Alte virusuri (poliomielite, Coxsackie etc.) sunt însă rezistente.

Cloroformul, deoxicocolatul de sodiu inactivează virusul gripal dar nu are acțiune asupra enterovirusurilor.

Bila și saponina inactivează unele virusuri (herpetic, vaccinal, gripal) dar nu acționează asupra altora (virusul poliomielitei).

Săpunul obișnuit și detergenții au în general o acțiune puternică de inactivare și distrugere a virusurilor.

Ionii metalelor grele (de exemplu Ag^{++}) inactivează virusul rabie, poliomieltic etc. fără a le altera capacitatea imunogenă. S-a încercat astfel să se obțină vaccin antirabic cu o înaltă putere imunogenă.

Coloranții vitali (albastru de toluidină, roșu neutru etc.) inactivează virusurile prin combinare cu acidul nucleic.

Antisepticele. Substanțele oxidante (apă oxigenată, permanganatul de potasiu, hipocloritii) au o puternică acțiune virulicidă. Formolul și fenolul, în comparație cu activitatea bactericidă a substanțelor oxidante, acționează și ele asupra virusurilor, dar mai lent și într-o măsură mai redusă. Formolul este folosit la prepararea vaccinurilor inactivate.

Sulfamidele și antibioticele nu acționează asupra virusurilor. Fac excepție unele virusuri mari (ornitoză, psitacoză, limfogranulomatoză venetrică) care sunt sensibile la tetraciclina.

7. INTERFERENȚĂ. INTERFERONI

Existența fenomenului de interferență a fost demonstrat atât experimental cât și în natură. Prin **interferență** se înțelege fenomenul prin care un virus de suprainfecție este împiedicat să pătrundă sau să se multiplice într-o celulă care este deja infectată cu alt virus. Virusul împiedicat poartă numele de **virus exclus** în timp ce virusul infectant existent se numește **virus interferent**.

În fenomenul de interferență virusul inițial modifică receptorii celulei gazdă sau căile metabolice care devin astfel inaccesibile virusului următor. De asemenea primul

virus stimulează celula infectată să sintetizeze *interferoni* care împiedică replicarea celui de-al doilea virus.

Interferonii constituie o clasă specială de proteine antivirale, netoxice, acido-stabile (pH 2,0), sensibile la tripsină, nedializabile, termorezistente (50° - 70°C) și care nu sedimentează la numărul de turații al ultracentrifugii la care se depun particulele virale.

Există două tipuri de interferoni, diferiți din punct de vedere fizicochimic și imunologic: interferon *standard* de tip I, citokină, sintetizat de celule alele decât leucocitele și interferon *leucocitar*, de tip II, limfokină, sintetizat de limfocitele T imune.

8. METODE DE CERCETARE A VIRUSURILOR

Ținând cont de particularitățile fizico-chimice și biologice ale virusurilor, în diagnosticul de laborator al virozelor se folosesc metode proprii specifice, adesea complet diferite de cele utilizate în diagnosticul bacteriozelor.

În produsele patologice corpusculei virale se găsesc în celule, țesuturi și organe. Prin izolarea și identificarea lor sau a unor componente virale (acid nucleic, proteine capsidale, hemaglutinină, neuraminidază, diverse polimeraze etc.) sunt necesare tehnici perfecționate fizice, biochimice și imunochimice.

Metode de izolare și purificare a virusurilor sau a unor componente virale

Pentru izolarea particulelor virale din matricea (membrană, nucleu celular etc.) în care acestea sunt incluse se utilizează procedee de solubilizare a acesteia cu ajutorul unor detergenți și solvenți organici, sonicare, digestie cu nucleaze sau enzime proteolitice (papaină, tripsină) sau tratate cu diverse săruri simple sau complexe (TRIS).

Extractul astfel obținut sau prin alte procedee este supus în continuare unor metode de separare și purificare a virusurilor prin:

- *precipitare fracționată* cu sulfat de amoniu sau alți agenți precipitanți (etanol, metanol) sau prin purificarea cu solvenți organici (di-eti-eter, cloroform etc.) urmat de ultracentrifugare și dializă.

- *cromatografia de adsorbție* care separă compuşii din amestec în funcție de mărimea moleculelor;

- *cromatografia pe coloană schimbătoare de ioni* care utilizează rășini sintetice speciale;

- *cromatografia de afinitate* în care un *adsorbant specific* (anticorp sau antigen) fixat pe un suport insolubil (granule de sticlă, polisiren, cărbune, celuloză, sepharoză) atrage selectiv dintr-un amestec numai componentul cu care se combină în mod specific antigenul sau anticorpul. După spălare cu soluții tampon adecvate, componenta specifică este eliberată și recuperată, prin eluare. Această tehnică stă la

baza unor tehnici de radio-imunometrie, foarte utilizate în prezent: RIA (radioimnodozarea) și RLP (radioimnoprecipitarea);

- *hemadsorbtia-eluția*, utilizată la concentrarea virusurilor hemaglutinante (Myxovirusurile). Virusurile se atașează, prin intermediul hemaglutininei de receptori hematice, iar agregatele formate, sedimentează ușor. Ulterior, virusul este eliberat de pe membrana hematice prin metode adecvate.

- *centrifugarea și ultracentrifugarea*.

Metode de identificare a virusurilor

În scopul identificării unui virus se continuă examenul de laborator pentru determinarea caracterelor fizico-chimice și biologice ale acestuia: *dimensiunea, forma și greutatea moleculară* (ce se stabilesc cu ajutorul microscopului electronic și al ultracentrifugării), *structura moleculară* (cu radiații X și microscopie electronică), *caractere antigenice* (prin imunoprecipitare, imunoelectroforeză, fixare de complement), *infektivitate* (numărarea unităților infectante, formatoare de plaje).

Dintre metodele serologice mai frecvent utilizate în virologie menționăm:

- *Reacția de sero-neutralizare*. Este folosită fie pentru a titra anticorpii neutralizanți dintr-un ser uman sau animal, în prezența unei suspensii de virus cunoscut, fie pentru a recunoaște și a titra un virus necunoscut, în prezența unui ser a cărui activitate este cunoscută. Se pun în contact cele două elemente, și după incubare, amestecul este inoculat pe culturi de țesut, pe ouă embrionate sau pe animal în funcție de sensibilitatea virusului din amestec. Dacă serul conține anticorpi, aceștia neutralizează virusul și acesta nu se va mai dezvolta, iar în caz contrar virusul nefiind neutralizat se va dezvolta și efectele sale vor fi puse în evidență (efect citopatogen pe culturi de celule, leziuni pe membrana chorio-alantoidă, moartea embrionului sau a animalului etc.).

- *Reacția de fixare a complementului* (RFC). Tehnicile folosite pentru reacția de fixare a complementului sunt cele clasice similare reacției Bordet-Wassermann, din sifilis sau microtestările în godeuri pe plăci de material plastic. Dificultatea constă numai în prepararea unui antigen viral corespunzător debarasat complet de resturile proteice provenind din țesuturile gazdei.

- *Reacția de inhibare a hemaglutinării*. (RHAI). Este o tehnică folosită în mod curent atunci când există virusuri hemaglutinante (gripă, parvovirus epidemică etc.). La baza reacției stă următorul principiu: virusul aglutinează hematiile (om, găină etc.). Serul specific inhibă această aglutinare la un titru cu atât mai ridicat cu cât conține o cantitate mai mare de anticorpi.

Reacția se poate efectua în tuburi sau în godeuri și va fi executată cel puțin de două ori în cursul bolii pentru a se putea aprecia dinamica titrului anticorpilor.

CAP. XXVI. VIRUSOLOGIE SPECIALĂ

1. VIRUSURILE GRIPALE

Gripa este o boală infecțioasă acută caracterizată clinic prin manifestări severe ale aparatului respirator și ale organismului în general și epidemiologic printr-o contagiozitate mare cu producerea de valuri epidemice care periodic, la intervale de 20-40 ani, se extind pe întreg globul sub formă de pandemii.

Gripa este produsă de *virusul gripal* (*Myxovirus influenzae*) cu genomul constituit din ARN, făcând parte din *genul Influenza-virus, familia Orthomyxoviridae*.

Virionul gripal are o formă sferică, uneori filamentoasă, cu diametrul de aprox. 100mμ. La suprafața sa se găsesc mici proeminențe filamentoase alcătuite din glicoproteine care constituiesc *hemaglutinina* și respectiv *neuraminidaza*, ambele având un rol important în activitatea biologică a virusului (infecțivitate, efecte toxice). Acestea sunt implantate într-un înveliș lipidic al particulei virale care la rândul său este plasat pe o matrice proteică. În interiorul acesteia se află *nucleocapsida* constituită din *nucleoproteina* conectată la 8 fragmente de ARN. Antigenul nucleocapsidic conferă virusului gripal specificitate de tip (A, B, C).

Hemaglutinina asigură absorbția virusului pe hematii și pe celulele ciliate ale aparatului respirator. Aglutinarea se produce prin interacțiunea dintre hemaglutinina și receptori specifici de pe hematii. Fenomenul este împiedicat de anticorpii specifici (principiul reacției de inhibare a hemaglutinării).

Neuraminidaza este o enzimă care permite eliberarea particulelor virale din celule, jucând astfel un rol important în gradul de infecțiozitate al tulpinii respective.

Hemaglutinina și neuraminidaza sunt glicoproteine cu specificitate antigenică, ele conferind virusurilor gripale specificitate de subtip și de variantă.

Astăzi sunt cunoscute 3 tipuri de virul gripal – A, B și C – care diferă între ele prin structura nucleoproteinei interne și a antigenelor proteice de suprafață. În tipul de *virus gripal A* se pot întâlni 3 subtipuri de hemaglutinină (H₁, H₂, H₃) și două subtipuri de neuraminidază (N₁, N₂), în diverse combinații.

Această complexitate a structurii antigenice poate explica apariția unor variații antigenice majore la virusul gripal de tip A (recombinări genetice, mutații etc.), care, surprinzând populația fără o imunitate corespunzătoare, a provocat marile pandemii cunoscute.

Virusul gripal de tip B are o structură mai unitară și la aceasta nu apar decât

variații antigenice minore fără implicații epidemiologice importante, iar virusul gripal tip C nu prezintă variații antigenice.

Fiecare tulpină de virus gripal este *codificată astfel*:

- tipul antigenic de ribonucleoproteina (A, B, C);
- țara sau localitatea în care a fost izolată;
- numărul de ordine al tulpinii, anul în care a fost izolată pentru prima dată și, în paranteză, simbolurile structurii antigenice ale subtipului de hemaglutinină și ale subtipului de neuraminidază. De exemplu, marea pandemie de gripă asiatică din 1957-1958 care a afectat 1/3 din populația globului a fost provocată de tulpina de virus gripal A/Singapore/1/57 (H₂N₂).

Virusul gripal poate fi conservat timp de câteva săptămâni la 0 - +4°C. Puterea sa infecțioasă este distrusă prin încălzire timp de câteva minute la 56°C, prin radiații cu U.V. sau tratament cu eter, formol, fenol. Hemaglutinina și antigenele fixatoare de complement sunt mai rezistente la agenții fizici și chimici decât particula virală.

Patogenie. Virusul gripal pătrunde în organism prin intermediul aerosolilor și afectează mucoasa căilor respiratorii. Neuraminidaza scade vâscozitatea stratului mucos expunând astfel receptori de la suprafața celulelor la pătrunderea virusului gripal care produce leziuni distructive urmate de descumărarea celulelor ciliate, infiltrate cu celule mononucleare și edem submucos. Când procesul afectează și parenchimul pulmonar, apar leziuni de tip interstițial. Starea toxică generală (febră, astenie, dureri musculare) însoțește de regulă sindromul gripal dar viremia apare în cazul când organismul este complet lipsit de apărare. Decesele și cazurile grave se întâlnesc în special la copii mici și la bătrâni cu afecțiuni pulmonare sau cardiovasculare cronice.

Unele animale de laborator (dihor, șoarece) sunt sensibile la infecția gripală dar, în practică, cultivarea virusului se face pe oul de găină embrionat prin inoculare în cavitatea amniotică.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul clinic de gripă nu poate fi realizat în afara perioadelor epidemice, deoarece numeroase alte infecții acute respiratorii se manifestă în mod asemănător.

Certitudinea unui diagnostic corect este dată de laborator prin izolarea și identificarea virusului gripal din spălmătură nazală, secreții nazale sau faringiene, spută. Titrurile de virus în aceste produse patologice sunt cu atât mai înalte cu cât sunt recoltate mai aproape de debutul bolii (1-3 zile). Când este necesar să se utilizeze un mediu de transport, acesta trebuie să conțină proteine iar conservarea trebuie făcută la rece: la frigider (+4°C) când examenul se face în câteva zile și la congelator (-70°C) când examenul se face după o perioadă mai mare de timp.

Cultivarea și izolarea virusului se poate obține prin inoculare în sacul alantoic sau amniotic al unor ouă de găină cu embrioni de 10 zile sau prin inoculare în culturi de țesuturi speciale. Trebuie știut că virusul nu produce decât efecte citopatice puține

și nes
hemac
Id
prin te
Di
ajutor
prin c
fluoro
Di
invest
clinic
antivi
conva
In
este g
are o
In pre
virusu
Rt
viață
acestu

Di

T

plastic

M

- Al

de tulpi

embrior

- plă

- sus

- sol

- enz

- citr

- ser

- ser

Seru

inhibitor

Reac

de pasăre

antigen

Ca măsuri generale în caz de epidemie menționăm:

- izolarea bolnavilor la domiciliu sau în spital pe durata bolii acute;
- limitarea circulației persoanelor expuse;
- educație sanitară etc.

De asemenea orice apariție epidemică a bolii se anunță și pe plan internațional la OMS iar tulpinile izolate se trimit la Centrele naționale și internaționale; se instituie supravegherea mersului epidemiei prin examene serologice de masă.

2. VIRUSUL RABIC

Rabia sau turbarea este encefalomielită acută comună omului și unor specii de animale. Boala este provocată de virusul rabic care este transmis de la animalul bolnav la om aproape exclusiv prin mușcătură. Evoluția clinică a turbării este rapidă iar sfârșitul este totdeauna letal.

Virusul rabic face parte din familia Rhabdoviridae. El are în general o formă cilindrică cu aspect de obuz, lung de 120 mμ și un diametru de 60-80 mμ. Acidul nucleic, ARN, este inclus într-o nucleocapsidă înconjurată de o membrană în constituția căreia se află și lipide. Virusul este sensibil la eter, cloroform și acetona precum și la radiații U.V. dar este destul de rezistent în mediul ambiant. Poate supraviețui timp de câteva săptămâni la temperaturi mai scăzute și poate fi conservat în glicerină sau prin liofilizare.

Virusul rabic poate fi cultivat prin inoculare intracerebrală la animale cu sânge cald (șoarece, iepure, cobai, hamster etc.), pe culturi de țesuturi sau pe ouă embrionate.

Virusul "**de strada**" izolat de la animalele bolnave produce boala obișnuită cu o perioadă de incubație variabilă. Acest virus întreținut prin inoculări intracerebrale repetate la iepure se transformă în virus "**fix**" cu multiplicare mai rapidă și cu o perioadă de incubație scurtă de numai 4-6 zile. Din astfel de tulpini cultivate prin inoculări intracerebrale la șoareci nou-născuți sau pe culturi de țesuturi sau pe ouă embrionate se prepară **vaccinuri rabice inactivate**. Pentru animale au fost preparate și **vaccinuri vii nepatogene** din tulpini virale atenuate.

Patogene. Virusul rabic, introdus în organism pe cale cutanată (mușcătură, înțepătură, plagă) se propagă prin nervii periferici spre sistemul nervos central, se multiplică provocând o encefalită acută, totdeauna mortală. Microscopic se constată infiltrații cu mononucleare, perivascularare și perineuronale însoțite de fenomene de degenerescență. În neuroni apar incluzii intracitoplasmice acidofile sfertice sau alungite, caracteristice encefalitei rabice denumite "**corpuculi Babes-Negri**". De asemenea apar leziuni degenerative în măduva spinării, glandele salivare și lacrimale și în pancreas.

Incubația bolii este variabilă, de la 7-8 zile la câteva luni sau chiar ani. În faza de debut apar cefalee, indispoziție și alte fenomene neuropsihice. Boala poate îmbrăca forma **furioasă** cu hidrofobie, agitație, halucinații, crize spasmodice sau forma

paralitică cu parestezii, somnolență și paralizii. Moartea survine de regulă după câteva zile, cel mult 10 zile de la debutul bolii, cu insuficiență respiratorie și circulatorie.

Tratament. Turbarea la om, odată apărută, este totdeauna fatală și, de aceea, tratamentul se adresează persoanelor suspecte de a fi infectate cu virus rabic și are drept scop blocarea și neutralizarea agentului patogen la poarta de intrare pentru a împiedica declanșarea bolii.

Tratamentul **local** trebuie instituit imediat și el constă din toaleta plăgii, spălare abundentă a locului mușcăturii cu apă și săpun, aplicarea unor antiseptice locale și infiltrații locale cu ser antirabie. Dacă este necesară o sutură a plăgii, aceasta nu va fi efectuată înainte de 48 de ore.

Tratamentul **specific** cu vaccin antirabie și ser antirabie va fi aplicat cât mai prompt.

Diagnosticul de laborator

În rabie, diagnosticul de certitudine a bolii poate fi oferit sigur și rapid de laborator. Animalele care au mușcat și sunt suspecte de turbare vor fi ținute în observație timp de 10 zile. Dacă animalul prezintă simptome tipice de turbare, este sacrificat și se decapitează pentru a se recolta materialul nervos necesar diagnosticului.

Dacă **transportul** la laborator durează mai puțin de 24 ore capul este trimis ambalat cu grijă într-o ladă izotermă. Când distanța este mare și durata depășește 24 ore se pot recolta fragmente din zonele de elecție ale sistemului nervos (Cornul lui Amon, secară și trunchi cerebral, cerebel) și glande submandibulare și se introduc într-un recipient de sticlă cu glicerină 50% în soluție fiziologică tamponată.

Este bine ca în timpul autopsiei și recoltării materialului nervos, operatorul, imunizat anterior antirabie prin vaccinare, să poarte mănuși și ochelari de protecție, iar recoltarea să se facă în condiții de sterilizare.

Examenui **macroscopic** evidențiază leziuni de meningoencefalită.

Examenui microscopic se execută pe preparate din materialul nervos recoltat din zonele de elecție și expus pe lame sub formă de frotiuri confecționate prin impresiuni sau etalare sau prin cupe histologice.

Diagnosticul rapid prin metoda Sellers

Amprentele proaspete, umede, preferabil pe secțiuni din Cornul lui Amon, se introduc într-un amestec în părți egale de albastru de metilen 1% în alcool metilic absolut și fucsină bazică 1% de asemenea în alcool metilic absolut. După colorare se spală frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează cu obiectivul cu imersie sau se montează în balsam de Canada. În caz de turbare apar incluzii rabice, rotunde sau ovale de cel mult 27 μ, de culoare roșie cu tenă magenta, cu granulații interne bazofile, localizate în interiorul citoplasmei, sau, în caz de ruperea membranei celulare, în afara celulei. Protoplasma celulelor are culoarea albastră, iar stroma culoare roz. Prezența incluziilor este patognomonică pentru diagnosticul de rabie.

Absența incluziilor rabice nu exclude diagnosticul de turbare și necesită continuarea precizării diagnosticului prin alte probe de laborator.

Diagnosticul histopatologic

În acest caz înainte de colorare este nevoie de o fixare a preparatelor histologice. Pentru o fixare rapidă se poate utiliza formolul. Cea mai bună metodă de fixare pentru punerea în evidență a incluziilor rabice este metoda Bouin-Dubosque-Brizil (Formol comercial 500 ml, alcool 96° 1100 ml, apă distilată 100 ml și acid picric 2 g). După fixare, care durează 24 ore, fragmentele de țesuturi sunt deshidratate cu alcool 96° și apoi cu alcool absolut după care sunt incluse în parafină.

Pentru a fi supuse colorării, preparatele sunt deparafinate și rehidratate. Se poate utiliza și colorația Sellers, dar metoda cea mai bună este *colorația Mann*. În acest din urmă caz secțiunile de material nervos, în prealabil deparafinate și deshidratate (3 băi de toluen a câte 10 minute, urmate de 3 băi de alcool etilic absolut a câte 10 minute și rehidratate 10 minute) sunt introduse într-un amestec de soluții apoase de albastru de metil și eozină (sol. de albastru de metil 1% 18 ml, sol. de eozină 1% 23 ml și apă distilată 49 ml) în care se mențin 24 ore la temperatura camerei. În continuare preparatele se spală cu apă de robinet, se scurg și se introduc într-o soluție de alcool sodat (NaOH 1,5% în etanol, 1 ml și etanol absolut 30 ml) pentru diferitețiere. După 10 minute, preparatele devin roz, se scot și se spală abundent cu apă de robinet. În continuare, preparatele se trec prin apă distilată acidă (40 ml apă distilată + 2 picături de acid acetic) timp de 1-2 minute, sunt deshidratate cu alcool absolut și apoi toluen după care sunt montate în balsam de Canada. Examinarea la microscop cu obiectivul 40 sau cu imersia pune în evidență corpuscule rabice de culoare roșie situati intracitoplasmatic cu un halou clar în jur și având o structură internă constituită din puncte bazofile, colorate în albastru închis. Citoplasma celei apare colorată în albastru azur iar cromatina nucleară în albastru închis. Între-o celulă pot fi mai mulți corpuscule rabici. Prezența acestor corpuscule confirmă diagnosticul de turbare. Absența lor nu infirmă diagnosticul de rabie.

Metoda anticorpilor fluorescenti

Este metoda de bază în diagnosticul turbării fiind precisă și rapidă.

Principiul metodei constă în cuplarea anticorpilor specifici cu fluorocrom, apoi punerea în contact a anticorpilor cuplați cu antigene specifice și evidențierea în spectrul ultraviolet, la microscop, a complexului antigen-anticorp fluorescent.

Diagnosticul rabiei prin metoda anticorpilor fluorescenti

Din materialul nervos de examinat (Cornul lui Amon, trunchiul cerebral și scoartă) se fac câte două amprente pe o lamă, etichetată. După uscarea amprentelor la temperatura camerei, acestea sunt sterilizate prin expunere la ultraviolete timp de 10 min, apoi lamele sunt introduse pentru fixare în acetona răcită la -20°C, timp de cel puțin 20 min. După fixare se aplică o picătură de ser fluorescent activ obținut prin

cuplarea anticorpilor rabici cu izotiocianat de fluoresceină, pe amprenta de lângă etichetă iar pe amprenta din partea opusă se aplică o picătură de ser fluorescent maror. Preparatul se introduce pentru 30 min la termostaț la +37°C, după care se ține într-o baie de tampon fosfat salin la pH = 7,2 timp de 10 min, cu limpezire de 2 min în apă distilată. După uscare se montează lamele pentru amprente, cu glicerină tamponată și se examinează în spectru ultraviolet.

În cazurile de diagnostic negativ, fluorescența specifică este absentă în ambele amprente.

Diagnosticul prin imunofluorescență este indicat în toate cazurile în care produsul de examinat este proaspăt, nealterat. Procesele de putrefacție denaturează exactitatea diagnosticului.

Când prin utilizarea probelor menționate nu s-a putut preciza diagnosticul se recurge la proba biologică, care asigură un diagnostic de certitudine.

Proba biologică constă din inocularea intracerebrală a materialului nervos la animale sensibile (șoareci albi nou-născuți sau adulți și iepuri). În acest scop, 1-2 g de material nervos este mojarat, suspensionat 10% în soluție salină fiziologică și centrifugat. Este preferabil ca la materialul ce urmează a fi inoculat să se adauge 10% ser normal, penicilină (500-1000 U/ml) și streptomycină (1-3 mg/ml) cu cel puțin 30 min înainte de inoculare.

La șoarecii nou-născuți se inoculează intracerebral 0,01 ml iar la șoarecii adulți 0,03 ml din suspensia de probă.

După inoculare șoarecii sunt observați zilnic. Începând din ziua a 4-a, se sacrifică în fiecare zi câte un șoarece și din creierul lui se fac amprente care sunt controlate prin imunofluorescență.

Când materialul inoculat provine de la un animal turbat, controlul prin imunofluorescență pune în evidență în creierul șoarecilor inoculați, antigenul rabic, cu 2-3 zile înaintea apariției semnelor clinice. În general la șoarece, semnele de turbare apar la 7-10 zile de la inoculare. Semnele clinice constau din apariția agitației și a unor contracții clonice, animalul ținând membrele anterioare și capul în extensie. În faza finală apar paralizi și în final moartea. În momentul apariției paraliziei animalul este sacrificat, se recoltează creierul în mod steril și se fac amprente care se examinează după colorația Sellers și în primul rând prin imunofluorescență.

Când din diverse motive proba nu este concludentă, pentru a ne asigura că este cu certitudine vorba de virusul rabic și nu de alt virus encefalogen se practică proba de seroneutralizare.

Proba de seroneutralizare constă, pe scurt, așa cum este executată în Institutul Cantacuzino, din amestecarea suspensiei de cercetat, în părți egale, o parte cu ser antirabic, o parte cu ser normal și o parte cu ser fiziologic. După o incubare de o oră la temperatura de 37°C se inoculează la șoarece. În caz de turbare supraviețuiesc șoarecii inoculați cu suspensie amestecată cu ser antirabic și fac turbare șoarecii din celelalte două loturi de animale inoculate.

Epidemiologie. Rezervorul de virus este constituit din speciile de animale cu

sânge cald care, fără excepție, sunt susceptibile de a se îmbolnăvi de turbare și de a transmite virusul existent în salivă în special prin mușcătură.

Deoarece în țara noastră rabia este transmisă la om în primul rând prin mușcătură de câine, se recomandă vaccinarea sistematică și ținerea sub supraveghere a acestor animale.

3. VIRUSURILE HEPATITICE

Hepatitele virale acute sunt boli specifice umane ce se manifestă prin fenomene generale infecțioase digestive și hepatice, însoțite sau nu de icter. Ele sunt provocate din căile se cunoaște până în prezent de cel puțin cinci virusuri hepatotropice, patogene pentru om: VHA, VHB, VHC, VHD și VHE.

Virusul hepatitic A (VHA) este un virus ARN de dimensiuni mici (27 mμ), sferic și face parte din familia *Picornaviridae*, genul *Enterovirus*. Principiul său antigen este Ag HA iar anticorpii corespunzători sunt anti-HA, IgG și IgM. Hepatita virală A este în general o boală ușoară, fără manifestări extrahepatice și adeseori anicterică și asimptomatică. Rezervorul de virus A este constituit din bolnavi cu icter sau asimptomatici. Agentul patogen este excretat prin fecale iar transmiterea se face aproape exclusiv pe cale fecal-orală, prin contact direct sau indirect prin intermediul alimentelor sau a apei contaminate. Recepțivitatea la boală este generală, iar imunitatea specifică este solidă și durabilă. Profilaxia bolii se face prin izolarea bolnavilor și controlul contactilor, educație sanitară, protecția apei și alimentelor, controlul igienico-sanitar al colectivităților și localităților.

Profilaxia specifică se poate face, pe cazuri individuale, cu gammaglobulină normală.

Virusul hepatitic B (VHB) este un virus ADN de formă sferică, cu diametrul de 42 mμ și face parte din familia *Hepadnaviridae*, genul *Hepadnavirus*. Principalele sale antigene sunt: AgHBs (antigenul de suprafață al VHB), AgHBe (antigenul central al VHB) și Ag HBe (antigen legat de antigenul central).

Ag HBs constituie învelișul extern al virusului Hepatitei B și are a structură complexă lipoproteică. El conține un determinant antigenic comun a care poate fi cuplat în diverse combinații cu câte o pereche de subdeterminanți antigenici y, w, r și d. Ag HBs apare în sângele bolnavilor înainte de debutul clinic al hepatitei astfel că depistarea sa servește la diagnosticarea bolii. Anticorpii anti Ag HBs apar în convalescență și prezența lor semnifică vindecarea bolii.

Componenta centrală (nucleocapsida virionului) este alcătuită din capsidă, ADN-polimerază și genomul viral. Capsida, compusă din 180 capsomere, conține un polipeptid și formează antigenul central al virusului hepatitic (AgHBe). El este decelat în celulele hepatice dar este absent în sânge.

Anticorpii anti-Ag HBe sunt anticorpi specifici IgM și prezența lor indică o infecție sigură. Ei dispar odată cu vindecarea bolii.

Antigenul HBe este un polipeptid solubil care apare în sângele bolnavilor de

timpuriu, odată cu Ag HBs. Când evoluția bolii este favorabilă, după o lună de la apariția icterului, apar și anticorpii anti HBe.

Genomul VHB este componenta esențială a nucleocapsidei. El constă dintr-un ADN circular, parțial bicatenar.

Virusul hepatitic C (VHC) este virusul posttransfuzional non A, non B care se transmite prin sânge și derivate de sânge. Anticorpii corespunzători anti AgHc apar în convalescență sau în hepatita cronică.

Virusul hepatitic Delta (VHD) - agentul etiologic al hepatitei virale delta, apare ca o suprainfecție la bolnavii cu hepatită virală B, agravând mersul bolii. Existența acestui tip de infecție condiționată se explică prin faptul că virusul delta este un virus defectiv care nu se poate replica decât în prezența virusului B. Anticorpii anti-Delta sunt anticorpi IgM și IgG și pot fi depistați ca de altfel și antigenul prin teste serologice specifice.

Virusul hepatitic E (VHE) este virusul hepatitic non A, non B, transmis pe cale enterală. Apariția anticorpiilor anti-VHE denotă instalarea unei imunități împotriva hepatitei E.

Diagnosticul de laborator al hepatitei virale

În diagnosticul orientativ al hepatitelor virale de un real folos sunt datele epidemiologice, datele clinice și mai ales rezultatele unor teste nespecifice hematologice (leucograma, VSH) sau biochimice (TGP - transaminaza glutamic-piruvică, TGO - transaminaza glutamic-oxalacetică, fosfataza alcalină, testele de disproteinemie, etc.).

Diagnosticul de certitudine al acestor afecțiuni nu poate fi obținut decât după efectuarea unor examene de laborator care au ca obiectiv identificarea antigenelor virale specifice și a anticorpiilor corespunzători în diverse produse patologice recoltate de la bolnavi (sânge, fecale, bilă, urină etc.). Există mai multe probe de laborator pentru acest scop dar, în prezent, sunt preferate testele RIA (radioimunologic) și ELISA (enzimologic) pentru specificitate și rapiditate.

Epidemiologie. Principiul rezervor de virus este omul bolnav și purtătorii cronici și asimptomatici care, în unele regiuni, reprezintă între 10-20% din populație.

Principalele căi de transmitere a agentului patogen sunt calea orală (VHA și VHE), în special prin intermediul alimentelor și a apei contaminate, și calea parenterală (VHB, VHC și VHD), prin transfuzii de sânge sau derivate de sânge contaminate, utilizarea unor seringi nesterilizate sau incorect sterilizate, folosirea instrumentarului stomatologic sau chirurgical la mai mulți pacienți fără sterilizare etc. Recepțivitatea la boală este generală iar imunitatea dobândită față de un anumit tip de virus hepatitic este solidă și durabilă.

Profilaxie. Depistarea precoce a bolnavilor și izolarea lor precum și o evidență corectă a contactilor și a purtătorilor de virus cu aplicarea unor măsuri adecvate constituie obiective importante în combaterea hepatitei virale.

Prevenirea transmiterii virusurilor hepatice prin inoculare se face prin controlul

corect al sângelui destinat transfuziilor, folosirea unor seringi de unică folosință și a instrumentarului stomatologic de investigare sau chirurgical corect sterilizat. Prevenirea transmiterii virusurilor pe cale orală se face în primul rând prin luarea unor măsuri de ordin igienic pentru protecția alimentelor și a apelor potabile dar și măsuri generale de educație sanitară și igienă individuală.

În stadiul actual protecția în masă față de VHB, în special a copiilor și a grupelor expuse unui risc crescut de contaminare se face prin vaccinare specifică cu preparate obținute din plasma purtătorilor de AgHBs sau cu vaccinul hepatitic ADN recombinant preparat din AgHBs produs de celule de drojdie de bere în care a fost inserată prin inginerie genetică gena subtipului a d w al VHB. De asemenea, în prezent sunt pe cale de realizare și alte vaccinuri împotriva celorlalte tipuri de virus, în special contra VHA. Un anumit grad de protecție poate fi obținut și cu gammaglobulină normală, care însă trebuie aplicată selectiv.

4. VIRUSURILE POLIOMIELITELOR

Poliomielita este o boală infecțioasă acută și transmisibilă provocată de virusul poliomicelitic. Numai un procentaj foarte redus, sub 1% din indivizii infectați cu virusul poliomicelitic face boala clinică manifestată prin paralizii provocate de distrugerea unor neuroni motori centrali.

Virusul poliomicelitic face parte din familia *Picornaviridae*, genul *Enterovirus*. Este un virus ARN, de dimensiuni foarte mici (28 mμ), cu o capsidă formată din 60 capsomere. Deoarece nu are lipide în capsida sa, virusul poliomicelitic ca și alte enterovirusuri, este rezistent la eter, etanol și diferiți detergenți. Este sensibil la U.V., formalin și cloramină.

Virusul poliomicelitic are 3 tipuri: 1, 2 și 3. Acestea sunt antigenic distincte și nu dau imunitate încrucișată. Virusul poliomicelitic este patogen pentru om și maimuțe. Tipul 2 este patogen și pentru șoarecele nou-născut. Toate cele 3 tipuri de virus poliomicelitic pot fi cultivate pe culturi celulare (rinichi de maimuță, HeLa, etc.) producând efecte citopatice caracteristice ce pot fi neutralizate cu seruri imune specifice de tip.

Patogenie. Virusul pătrunde în organism pe cale orală prin mucoasa orofaringiană și a tractului respirator superior. Aici, probabil în celulele sistemului reticuloendotelial, se produce prima multiplicare după care prin intermediul secrețiilor orale pătrunde în tubul digestiv. Din stomac, trece nealterat, nefiind afectat de aciditatea gastrică, în intestinul subțire unde urmează o nouă fază de multiplicare. Majoritatea cazurilor se opresc în această fază clinic inaparentă. Când însă bariera intestinală este depășită se produce stadiul de viremie. În acest stadiu virusul poliomicelitic poate fi neutralizat de anticorpii specifici circulanți și evoluția bolii este jugulată sau dimpotrivă virusul poate invada sistemul nervos central și apare boala clinică. Virusul poliomicelitic traversează bariera hematoencefalică sau trece prin sinapsa mioneurală și prin cilindraxoni și măduvă ajunge la creier. În sistem nervos

central, virusul se multiplică în celulele nervoase, în special în neuroni motori pe care îi distruge. În funcție de numărul neuronilor afectați și de localizarea acestora se produc paraze sau paralizii ce pot fi uneori urmate și de contracturi spastice.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul de certitudine se bazează pe izolarea și tipajul virusului poliomicelitic la care se adaugă testele serologice.

Pentru izolarea virusului poliomicelitic se iau probe din spălături nazofaringiene, din materii fecale, L.C.R. sau țesut nervos (porțiuni de măduva spinării și din creier) recoltate la necropsie. În primele două săptămâni de boală virusul este găsit într-o mare proporție în aceste produse patologice. Fragmentele de țesut nervos pot fi examinate și din punct de vedere histopatologic. Înainte de a fi inoculate pe culturi de celule, probele trebuie decontaminate de bacterii prin tratare cu antibiotice (penicilină + streptomycină).

Virusul poliomicelitic produce efecte citopatice caracteristice. Pentru ca virusul poliomicelitic să fie identificat și tipizat se practică neutralizarea specifică a acestor efecte citopatice cu seruri antipoliomicelitice monospecifice de tip 1, 2 și 3.

Reacția de seroneutralizare pe culturi de țesut

Proba de virus pe care se efectuează **reacția de neutralizare** pentru identificarea poliovirusurilor este reprezentată de suprenatantul culturilor celulare în care a apărut un efect citopatice după inocularea produselor patologice. În reacția de seroneutralizare se vor utiliza maximum 10.000 doze infectante medii de virus (ceea ce se realizează de regulă diluând suspensia de virus 1/1000).

Serurile liofilizate, reconstituite cu 0,5 ml apă distilată, se diluează în final la diluția indicată pe etichetă pentru fiecare serie în soluție Hanks.

Se va avea în vedere că în reacția de seroneutralizare serul se diluează 1/2 cu suspensie de virus, iar atunci când se folosește pentru identificare amestecuri de câte 2 seruri, diluția inițială trebuie să fie de 4 ori mai mică decât cea finală recomandată.

Se prepară amestecuri de câte 2 seruri pentru identificarea unui tip de poliovirus — cel care nu intră în amestec — și un amestec din toate cele 3 seruri pentru delectarea în produs a unui enterovirus nepoliomicelitic.

Pentru fiecare amestec din câte 2 sau 3 seruri se calculează volumul necesar a fi preparat, în funcție de numărul de probe de identificat, în ziua respectivă.

Din fiecare amestec de seruri se repartizează în tuburi câte 0,3 ml peste care se adaugă un volum egal din diluția probei de virus de identificat, având grijă să nu rămână virus pe pereții tubului. Se agită energic conținutul imediat după efectuarea fiecărui amestec de neutralizare. După fiecare probă de virus se prepară și un amestec martor (virus + diluent, în loc de ser).

Amestecurile se lasă 2 ore la 37°C și peste noapte la +4°C. A doua zi, din martorul de virus și din tuburile cu amestec virus ser, se inoculează câte 2 tuburi cu cultură celulară monostrat (celule renale simiene sau linii celulare susceptibile la enterovirusuri).

La 2 și 6 zile culturile se examinează la microscop, notându-se prezența sau absența

un virus cu diametru de 140 mμ. Este format dintr-o nucleocapsidă cu ARN și un înveliș constituit din lipide, glicoproteine și polipeptide. Antigenul care participă la RFC este prezent în nucleocapsidă iar infectivitatea, capacitatea de hemaglutinare și hemoliză (în de stratul extern. Există un singur tip antigenic.

Virusul rujeolic este inactivat prin căldură (o oră la 56°C), radiații U.V., formol.

Patogenie. Virusul pătrunde în organism pe cale respiratorie prin mucus nazofaringiană și conjunctivală. Se multiplică în țesuturile limfoide după care se răspândește pe cale sanguină în tot organismul. În formele severe de boală apar fenomene de imunosupresie cu scăderea numărului de limfocite T și B. Imunitatea dobândită după boală sau vaccinare durează practic toată viața.

Diagnosticul de laborator. Diagnosticul rujeolei se pune destul de ușor dacă avem date epidemiologice (sezon rece, mediu epidemic) și o simptomatologie clinică caracteristică (catar ocular și al căilor aeriene superioare, enantem, erupție maculo-papuloasă).

Izolarea virusului din sânge sau exsudat nazofaringian se poate face pe culturi de țesuturi pe care apar plaje caracteristice, dar tehnica nu este de uz curent.

Reacțiile serologice care permit de asemenea un diagnostic de laborator sigur sunt: reacția de hemaglutinoinhibare, RFC, reacția de neutralizare, ELISA și imunofluorescență.

Crescerea rapidă și progresivă a titrului specific al anticorpilor, care începe odată cu apariția erupției, în probele recoltate la debut și după 7 și 14 zile, se înregistrează în toate cazurile de rujeolă.

Epidemiologie. Rujeola este o boală endemo-epidemică care apare în valuri epidemice la intervale de 2-3 ani.

Sursa de infecție este constituită exclusiv de omul bolnav.

Transmiterea bolii se face în general direct, pe cale aerogenă prin picăturile din secreția nazofaringiană și numai rareori indirect prin intermediul unor obiecte recent contaminate de bolnav.

Receptivitatea la boală este generală dar, după îmbolnăvire, imunitatea este puternică și durează toată viața.

Profilaxia bolii se bazează pe o *imunizare* activă, sistematică a întregii populații infantile. În acest scop se utilizează un vaccin rujeolic viu atenuat care se administrează într-o singură doză pe cale parenterală.

Pentru protecție, în cazuri speciale se pot utiliza și imunoglobuline umane specifice anti-rujeolă.

7. VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV)

SIDA (AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrom) constituie cel de-al patrulea stadiu, și ultimul, al evoluției infecției cu virusul imunodeficienței umane HIV = Human Immunodeficiency Virus), ce se caracterizează prin depresie imună

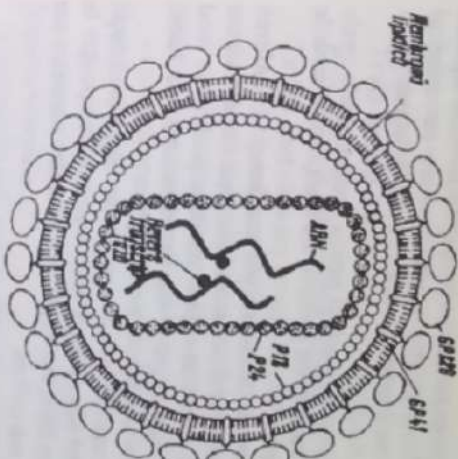


Fig 26 Virusul imunodeficienței umane (schematic).

ARN viral și reverstranscriptaza.

Tulburările răspunsului imun în infecția cu HIV derivă din distrugerea selectivă a limfocitelor T₄, care joacă un rol principal în reglarea imunității.

Diagnosticul etiologic al SIDA necesită detectarea anticorpilor față de virus sau structurile sale antigenice și/sau detectarea virusului sau a antigenelor virale.

În acest scop se utilizează o serie de teste de laborator care:

- detectează anticorpii anti-HIV și anticorpii neutralizanți;
- detectează antigenele virale, ARN-ul viral;
- permit izolarea virusului.

În practică, **testul serologic ELISA** (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) este cel mai frecvent utilizat. El folosește ca antigen lizatul viral total și pune în evidență anticorpii specifici din serul de cercetat. Acest test nu este suficient de specific, putând da rezultate fals pozitive sau fals negative, deoarece antigenul brut menționat conține și fracțiuni antigenice ale limfei celulare pe care a fost cultivat virusul. Fiind însă un test rapid și relativ ieftin, testul ELISA este în prezent foarte utilizat în controlul sângelui și al preparatelor de sânge, precum și pentru controlul grupelor de risc. Confirmarea, însă, a cazurilor individuale de infecție detectate prin testul ELISA este acceptată numai după obținerea unui nou rezultat pozitiv cu o altă trusă ELISA, de concepție diferită și efectuarea unui test de confirmare: Western Blot, imuno fluorescență sau imunoprecipitare. Dintre acestea din urmă, cel mai utilizat este testul Western Blot. Acest test se bazează pe punerea în contact a serului de cercetat cu antigene HIV purificate, separate prin electroforeză, transferate pe hârtie de

majoră, acutizarea infecțiilor virale, bacteriene, parazitare, fungice și a tumorilor cu evoluție invariabilă spre deces în cel mult 2 ani la adulți și mai puțin de 1 an la copii.

Etiologia bolii a fost stabilită de francezul Luc Montagnier (1983) și americanul Robert Gallo (1984).

Virusul imunodeficienței umane (HIV) face parte din clasa retrovirusurilor, a căror denumire decurge din faptul că aceste virusuri ARN posedă o enzimă (reverstranscriptaza) capabilă să transforme ARN-ul în ADN. Există două tipuri: HIV-1 și HIV-2.

Virusul are un diametru de 100nm. La suprafață prezintă un înveliș glicoproteic lipidic. Partea centrală este alcătuită din proteine,

nitroceluloză, și incubate. Anticorpii care se fixează pe polipeptidele virale separate prin electroforeză sunt puși în evidență printr-o nouă incubare cu anticorpi anti-gammaglobulină umană, conjugați cu o enzimă marker, care va acționa pe un substrat enzimatic.

Serurile în care au fost detectați anticorpi specifici pentru componentele virale cunoscute (centrale sau de înveliș) sunt considerate pozitive. De menționat că serurile cu anticorpi nespecifici dau reacții negative.

În general, rezultatele explorărilor de laborator pot confirma sau infirma diagnosticul de SIDA, dar în unele situații pot fi neconcludente. Sunt neconcludente rezultatele testelor de laborator atunci când s-au obținut rezultate pozitive în mod repetat cu un test ELISA, dar acestea sunt negative sau neconcludente prin testul Western Blot, imuno fluorescență, culturi sau detectare de antigene.

De asemenea, sunt neconcludente rezultatele în situația în care serul unui copil mai mic de 15 luni născut dintr-o mamă seropozitivă este în mod repetat pozitiv la testul ELISA și chiar prin testul Western Blot, dar nu prezintă tulburări imunitare sau are un rezultat negativ pentru antigene sau culturi.

Epidemiologia infecției cu virusul imunodeficienței umane

Pe baza ultimelor date cunoscute de O.M.S., răspândirea infecției cu HIV se accelerează în mod dramatic, astfel că, spre sfârșitul anului 1991, numărul persoanelor infectate se ridică la circa 10 milioane de oameni. La sfârșitul acestui mileniu se prelungește numărul acestora va fi de 15-20 milioane, urmând ca în următorii zece ani să se înregistreze aproximativ 3 milioane de decese în rândul femeilor și copiilor, dacă măsurile de prevenție și cele terapeutice nu vor înregistra salturi spectaculoase.

În țara noastră, la sfârșitul lunii decembrie 1992, erau înregistrate 2235 cazuri de SIDA, din care 1300 la sexul masculin. În grupa de vârstă până la un an au fost înregistrate 471 de cazuri, respectiv 21,1%. S-a constatat că la adulți calea de transmitere este predominant heterosexuale, o statistică arătând că, în 50% din cazuri, îmbolnăvirea se datorează contactelor cu parteneri mulți, iar în 22% contactelor cu partener pozitiv.

Sursa de infecție este reprezentată de omul infectat, boala evoluând cronic și invariabil către deces.

Principalele **căi de transmitere a infecției** sunt:

a) **inoculare de sânge** prin:

- transfuzii de sânge sau preparate de sânge;
- înțepături cu acul, plăgi deschise, expunerea mucoaselor la contactul cu sânge;
- injecții cu ace și/sau seringi nesterilizate.

b) **sexuală**:

- homosexuală;
- heterosexuale.

c) **de la mama infectată la făt.**

Transmiterea infecției prin înțepături de insecte, salivă, utilizarea în comun a unor tacâmuri sau veselă nu a fost demonstrată.

Receptivitatea la infecție nu este suficient de bine cunoscută.

Tratamentul. SIDA nu beneficiază până în prezent de o medicație eficientă.

Prevenirea și combaterea infecției cu HIV

Ținând cont că la ora actuală nu există o terapie antivirală eficientă și nu dispunem de un vaccin specific anti-SIDA, atenția cadrelor sanitare se va îndrepta în mod special asupra măsurilor generale de prevenție și combatere a bolii. Astfel:

- Vor fi încadrate într-un sistem organizat de supraveghere epidemiologică grupele cu risc crescut de infectare și de transmitere a infecției. Din această categorie fac parte: - contactii sexuali ai cazurilor de SIDA și ai celor HIV pozitivi asimptomatici, identificați prin anchetă epidemiologică;
- persoanele cu comportament sexual modificat (homosexuali, prostituat);
- persoanele cu boli transmisibile sexual, aflate în evidența secțiilor dermato-venereice;
- persoanele care vin din țări străine cu risc de infecție crescut.

Se vor efectua anchete epidemiologice sistematice.

Se va face testarea clinico-epidemiologică și serologică a donatorilor de sânge, gravidele și tinerilor înainte de căsătorie.

De asemenea, vor fi inițiate acțiuni de educație sanitară în special în licee și alte instituții de tineret.

Măsuri de protecție a personalului de laborator

- Personalul care manipulează produse patologice și materiale cu potențial infecțios va purta în mod obligatoriu măști de cauciuc.

- Mesele de laborator și alte suprafețe care vin în contact cu materialul infectat vor fi decontaminate cu cloramină 2-4%, după fiecare ședință de lucru.

- La sfârșitul zilei de lucru se va scoate echipamentul de protecție, iar mâinile vor fi spălate și dezinfectate.

- Perioodic, personalul va fi instruit pentru aplicarea riguroasă a măsurilor de profilaxie a infecției cu HIV.

- Controlul (testarea) personalului, la 6 luni, de către un laborator.

- Se va lucra, obligatoriu, cu pipete automate.

- În caz de înțepături sau contaminare cu sânge sau alte lichide biologice patologice se va proceda la o spălare energică cu apă și săpun.

- Personalul sanitar trebuie să știe că infecțiozitatea HIV este slabă, dar că trebuie să ia în permanență toate măsurile de a se proteja de contaminare, având în vedere prognosticul sumbru al SIDA și faptul că, până în prezent, nu s-a realizat un vaccin profilactic sau terapeutic.

CAP. XXVII. NOȚIUNI GENERALE DE PARAZITOLOGIE

1. PARAZITISM ȘI RELAȚIILE PARAZIT-GAZDĂ

În secolele trecute, paraziții erau priviți ca o grupă de viețuitoare cu totul izolată și se atribuia apariției lor un sens misterios, socotindu-i ca "generații spontane". Odată cu includerea paraziților în sistemul general al lumii animale, a apărut necesitatea de a se defini paraziții și știința care se ocupă cu studiul lor.

Parazitologia este știința care se ocupă cu studiul morfologiei și biologiei paraziților, precizând relațiile care se stabilesc între paraziți și gazdele lor. Prin obiectul său, parazitologia este o ramură a biologiei generale.

Ca și multe alte viețuitoare, și organismul uman poate găzdui numeroși paraziți. Studiul acestor paraziți, al tulburărilor produse de ei în organismul uman parazitat, epidemiologia, terapia și combaterea lor constituie, în ansamblu, **parazitologia medicală**.

Pentru a putea înțelege ce reprezintă parazitologia, trebuie precizat, în primul rând, ce reprezintă un **parazit** și ce se înțelege prin **parazitism**:

– **parazitul** este o ființă de natură vegetală sau animală care trăiește temporar sau definitiv pe seama altei ființe vegetale sau animale, desori producându-i tulburări evidente;

– **parazitismul** reprezintă un mod de viață în care o ființă folosește în parte sau în totalitate ca mediu necesar vieții sale o altă ființă.

În felul acesta, parazitismul ar reprezenta o asociație biologică particulară între doi factori, în care unul oferă locuință și hrană și reprezintă organismul-gazdă, iar celălalt este cel care folosește organismul-gazdă pentru a trăi, și reprezintă parazitul.

– **gazda** este, deci, ființa pe seama căreia trăiește parazitul, iar **parazitul**, ființa care trăiește pe seama gazdei. Viețuitoarele astăzi parazite nu au fost însă dintotdeauna parazite. Ele descind filogenetic din ființe ce duceau în trecut o viață liberă și care, ajunse accidental în organismele astăzi gazdă, s-au adaptat la noi condiții de viață. Astfel, parazitismul, la început accidental, s-a adevărat treptat în forme variate, transformându-se în parazitism obligatoriu. Putem deosebi mai multe tipuri de relații care se stabilesc între indivizii unor specii diferite. Astfel:

– **Saprofittismul** reprezintă primul pas spre viața parazitară. Saprofitele se împart în **saprofite propriu-zise** (bacterii, ciuperci ș.a.) și **saprozoice** – organisme care se dezvoltă pe substanțe de descompunere (larvele diferitelor specii de muște).

– **Comensalismul** reprezintă un mod de viață a două ființe în care una trage foloase (prisos de hrană, protecție, locuință) de pe urma celei de-a doua (gazda), care nu este cu nimic vătămată.

– **Mutualismul** reprezintă o asociație biologică mai strânsă între două ființe, deoarece în acest caz ambii indivizi își aduc servicii reciproce.

– **Simbioza** reprezintă raportul biologic cel mai strâns dintre doi indivizi, care în acest caz vor alcătui o adevărată unitate biologică.

– **Parazitismul adevărat** este caracterizat prin faptul că gazda suferă din cauza parazitului, care se hrănește și se dezvoltă pe seama sa. Acesta "atacă" lent, dar continuu, gazda, sfârșind desori prin a o distruge.

Pe lângă paraziții obișnuți, care trăiesc pe seama unui organism-gazdă, există cazuri în care paraziții bine hrăniți și bogați în substanțe nutritive de rezervă devin, la rândul lor, surse pentru obținerea hranei pentru alți paraziți mai mici. Acești paraziți ai paraziților se numesc **hiperparaziți**.

Relațiile care se stabilesc între o gazdă și un parazit pot fi, în general de trei feluri:

– acțiunea parazitului asupra gazdei poate depăși puterea de apărare a gazdei, care se îmbolnăvește și poate muri;

– acțiunea parazitului asupra gazdei este mai redusă în raport cu capacitatea de apărare a acesteia, care rămâne sănătoasă, rezistând agresiunii parazitare;

– acțiunea parazitului asupra gazdei este slabă și, treptat, organismul-gazdă elimină parazitul.

2. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZIȚILOR.

2.1. CĂILE DE CIRCULAȚIE A PARAZIȚILOR ÎN NATURĂ

Perpetuarea speciei la un parazit este asigurată în natură prin căile de circulație de la o gazdă la alta, iar întreruperea acestora împiedică desăvârșirea ciclului biologic. Circulația paraziților nu este asemănătoare, ea prezentând diferențe importante de la un grup de paraziți la altul sau chiar de la o specie la alta.

Relativ simplă la unii paraziți, la care transmiterea se face direct de la organismul-gazdă infectat la organismul-gazdă sănătos receptiv, ea devine din ce în ce mai complicată la paraziți al căror ciclu evolutiv reclamă un stadiu în sol, sau extrem de complicată la paraziți care își desăvârșesc ciclul biologic în una-două gazde intermediare.

Sistematizând căile de circulație a paraziților în natură, se pot deosebi:

Parazitisme transmise direct (contagioase) la care ouăle, larvele, formele chistice sau vegetative prezente în fecale sau secrețiile boalașului sunt eliminate în stadiu infectat. Deci, la acestea, transmiterea se realizează direct de la o persoană la alta sau prin intermediul variațiilor factori de mediu, care au simplul rol de a le vehicula.

Parazitisme transmise indirect:

– *prin sol și apă* se transmit parazitisme în care ouăle sau larvele parazitului,

neinfecțante în momentul eliminării de către bolnav, ajung în stadiul infecțiant după o perioadă de incubație în sol, variabilă în raport cu parazitul:

— *prin carnea unor animale consumată de om* (insuficient prelucrată termic) se pot contracta parazitozile. Ouăle sau larvele neinfecțante în momentul eliminării de către bolnav ajung în stadiu infecțiant în carnea unor animale, care este apoi consumată de om.

Circulația parazitilor în natură nu se limitează însă numai la om și animale domestice. Pe lângă această circulație, care este cunoscută sub numele de *focar peridomestic* sau *sinantrop*, mai există și circuite biologice ale parazitilor cu mai multe gaze definitive și cu gaze intermediare reprezentate de animale sălbatice (*focare naturale*).

2.2. RĂSPÂNDIREA GEOGRAFICĂ A PARAZITILOR

Circulația parazitilor în natură depinde de **prezența parazitului, de prezența gazdelor intermediare și de prezența condițiilor de mediu fizic extern**, care asigură realizarea legăturii între paraziți și gazele lor. Există, în felul acesta, parazitozile de importanță mondială, care sunt răspândite pe aproape întreaga suprafață a globului unde se găsească condițiile de răspândire (*ascariidoza, hidatidoza, oxituroza*), după cum există parazitozile de importanță strict locală, în care existența în anumite teritorii a gazdelor intermediare sau a vectorilor limitează răspândirea parazitozelor ca, de exemplu, *boțiocefaloza* în deltele unor fluviu, *malaria* între 60° latitudine nordică și 40° latitudine sudică sau *anchilostomioza*, a cărei răspândire în zonele temperate este condiționată de prezența unor condiții speciale, care se întâlnesc numai în unele mine de cărbuni. În mod asemănător, condițiile de mediu fizic extern, obiceiurile populației, grupele de vârstă și altele pot limita răspândirea unor parazitozile. Astfel, absența *ascaridozei* în zonele polare este datorată imposibilității dezvoltării în sol a elementelor infecțante, din cauza frigului.

Stabilitatea arilor geografice de răspândire a parazitozelor și cunoașterea căilor de transmitere sunt extrem de importante, ele stând la baza organizării măsurilor de prevenire și combatere a tuturor bolilor parazitare.

Cap. XXVIII. PROTOZOLOGIE

1. CARACTERE GENERALE, CLASIFICARE

Încrengătura protozoarelor cuprinde ființe al căror corp este format dintr-o singură celulă, iar protozoologia constituie capitolul din zoologie care studiază morfologia și biologia acestor organisme unicelulare.

În cazul parazitologiei medicale, protozoologia studiază numai protozoarele parazite ale organismului uman, preocupându-se în mod deosebit de imbolnavirile pe care acestea le produc, mijloacele de diagnosticare, prevenire și combatere a lor.

Așa cum s-a arătat, protozoarele sunt ființe al căror organism este constituit dintr-o singură celulă, având toate funcțiile necesare existenței și perpetuării speciei. Această celulă, care reprezintă protozoarul, este formată dintr-o masă protoplasmatică, un nucleu, o membrană de înveliș și, uneori, atunci când mișcarea sa nu este amoeboidă organisme speciale pentru locomotie — flageli sau cili. Prezența sau absența la unele protozoare a altor numeroase organisme diferențiază clasele în care sunt grupați acești paraziți.

Cele mai multe dintre protozoare trăiesc liber, în special în apa colectată din mediul înconjurător. În condiții de umiditate și temperatură convenabile, când toate funcțiile acestui organism unicelular se desfășoară normal, protozoarul îmbracă așa-numita *formă vegetativă*, care îndeplinește funcțiile principale vitale: asimilarea, dezasmilarea, înmulțirea. Când din diferite cauze exterioare această formă vegetativă ajunge în condiții de viață nefavorabile (uscăciune, temperatură scăzută etc.), forma vegetativă își protejează corpul cu o membrană mai rezistentă de înveliș, se transformă în *formă chistică*. În interior, își adună rezerve nutritive și duc o viață latentă până în momentul în care se întâlnesc din nou condiții prielnice de viață. Atunci își revin forma de *viață vegetativă*.

Din protozoarele libere, în decursul timpului, unele s-au adaptat parțial sau total la una din mai multe gaze animale, devenind protozoare parazitare. Acestea se răspândesc de la o gazdă la alta, *uneori direct* prin forme vegetative eliminate de gazda bolnavă odată cu secrețiile sau excrețiile sale, sau prin forme chistice care ajung în mediul înconjurător, apă, sol, legume. Din secrețiile omului bolnav sau din apa infectată cu forme chistice se poate îmbolnăvi omul sănătos.

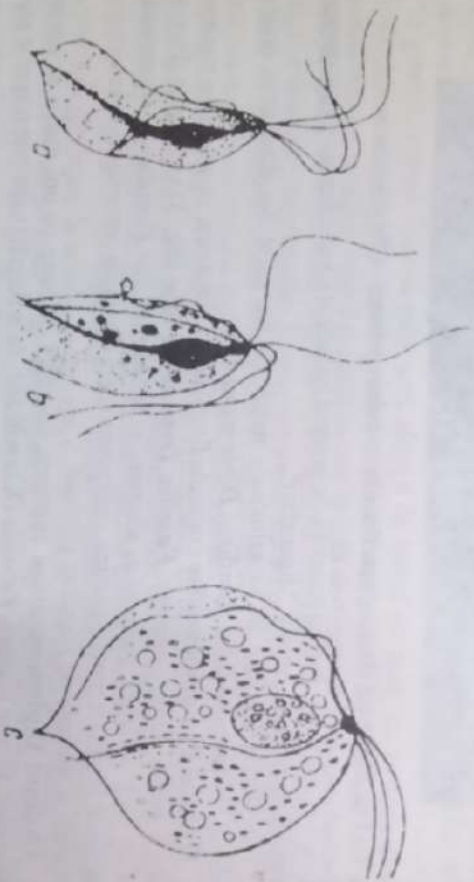
Alte protozoare, care se *răspândesc indirect*, au nevoie de o gazdă intermediară pentru a trece din organismul-gazdă infectat într-un alt organism sănătos. Acestea nu se mai închistază, însă deseori gazda intermediară reprezintă o etapă obligatorie în ciclul evolutiv al protozoarului.

tubului digestiv și *Trichomonas vaginalis*, paraziți ai aparatului urogenital la femeie sau la bărbat.

Trichomonas elongata sau **buccalis** (fig. 32, a) nu dă tulburări grave în cavitatea bucală pe care o parazitează, trăind mai mult în cării denare, cripă amigdalienă la aproape 20% din populație. Paraziții este mai răspândit la copii și la persoane cu afecțiuni dentare. Transmiterea se realizează prin contact direct, picături de salivă, pahar etc.

Trichomonas intestinalis este un flageliat de formă asemănătoare cu primul, dar puțin mai mare (10 - 20 μ lungime) (fig. 32, b). Paraziții este localizat în om în zona ileocecală, de unde invadează intestinul gros și subțire, producând enterocolita trichomonazică. Bolnavii au 3-4 scaune pe zi, cu caracter de puretație, însoțite de dureri abdominale și tenesme.

Boala este destul de frecventă și, după cercetările din țara noastră, ea poate fi întâlnită mai rar la adulți și mai frecvent la copii mici. Rezervorul de paraziți în natură



este constituit de câine și pisică, ce se infectează de la om și care, la rândul lor, pot infecta omul, iar mușciele au simplul rol de a vehicula paraziții.

Diagnosticul bolii se face evidențind paraziții prin examenul microscopic al materiilor fecale proaspete emise sau prin coprocultură, pe mediul Simi. Tratamentele se fac cu Metronidazol.

Trichomonas vaginalis este cel mai patogen dintre cele trei specii care parazitează organismul uman. Paraziții este ovalar sau piriform, lung de 10-30 μ, prezentând 3 până la 5 flageli liberi și o membrană ondulantă care depășește extremitatea posterioară a corpului paraziților (fig. 32 c, d). Are un nucleu oval, așezat mai mult spre polul anterior, un chinetoplas, loc de inserție al flageliilor, un axostil și o coastă de întărire a corpului. Ca și celelalte două specii parazite ale organismului uman, nici *Trichomonas vaginalis* nu posedă sau, mai exact, nu i s-a descris încă forme chistice, transmiterea realizându-se direct prin forme vegetative de la omul bolnav la omul sănătos, prin raport sexual.

Trichomonaza

Paraziții se localizează, de regulă, la femei în cavitatea vaginală, de unde poate invadea secundar aparatul urinar. Considerată în zilele noastre ca o boală venereală, trichomonaza vaginală se transmite de la femeia la bărbat, unde paraziții se cantonează în prostată și de unde va fi eliminat odată cu lichidul prostatic, reinfectând femeia.

Rolul patogen al paraziților constă în inițierea puternică a mucoasei, deoarece atacă celulele epitelului vaginal pentru a utiliza glicogenul ce îl conțin. Leziunile produse sunt la început superficiale, apoi profunde, realizând ulceratii și zone echinotice mai frecvente în fundul de sac posterior al cavității vaginale, dar care pot cuprinde uneori întreaga mucoasă vaginală, colul uterin, apoi vezica urinară. Femeia bolnavă prezintă o secreție vaginală albă, spumoasă, destul de abundentă, cu prurit și arsuri vaginale, iar în cazul invadării uretrei, arsură și tulburări de micțiune.

În raport cu tulburările pe care le produce paraziții în aparatul urogenital femeie, infecția la bărbat este în cele mai multe cazuri fără manifestări clinice.

Epidemiologie. Omul este singurul transmitător al bolii. Transmiterea se realizează direct pe cale venereală (prin contact sexual) și mai rar indirect prin intermediul obiectelor contaminate.

Incubarea bolii este scurtă, de 3-7 zile, iar boala este răspândită pe întregul glob, cu o frecvență mai ridicată la grupa de vârstă 18-35 de ani, pentru ambele sexe.

Diagnosticul bolii, de suspiciune prin manifestările clinice, este precizat de laborator prin evidențierea paraziților în secreția bolnavului.

Metodele de diagnostic atît pentru femeie, cît și pentru bărbat, sunt: - **examenul direct** între iană și ianella a secreției emulsionate cu ser fiziologic cald (37°C), efectuat imediat după recoltare, în care se evidențiază paraziții cu ușurință, prin mișcările lor caracteristice;

- **examenul secreției** colorate după metoda May-Grunwald-Giemsa;

– examenul prin cultur pe medii artificiale care permite, cu cel mai ridicat coeficient de certitudine, precizarea diagnosticului.

Tratamentul bolii constă în administrarea concomitentă de medicamente, atât solului, cât și soșei, sub control medical, completat cu controale de laborator după cei mult două cicluri menstruale la femeie și la o lună la bărbat. Dintr-un medicament este cea mai mare eficiență fac parte produsele de tip Metronidazol sau Tinidazol.

Profilaxia bolii, pe lângă aspectele legate de transmiterea veneniană, mai trebuie să cuprindă o bună igienă personală.

3.2. FAMILIA OCTINIDAE

Familia Octinidae cuprinde flagelate cu simetrie bilaterală a corpului: 2 nuclee și 8 flageli.

Din genul *Giardia*, în parazitologia medicală ne interesează specia *Giardia intestinalis*, cunoscută și sub numele de *Lambliia intestinalis*.

Acest parazit, localizat în intestinul subțire al omului, își desăvârșește ciclul evolutiv în cele două forme cunoscute pentru protozoare – forma vegetativă și forma de chist.

Forma vegetativă (trofozoit) este piriformă, cu o lungime de 10-12 μ și o lățime

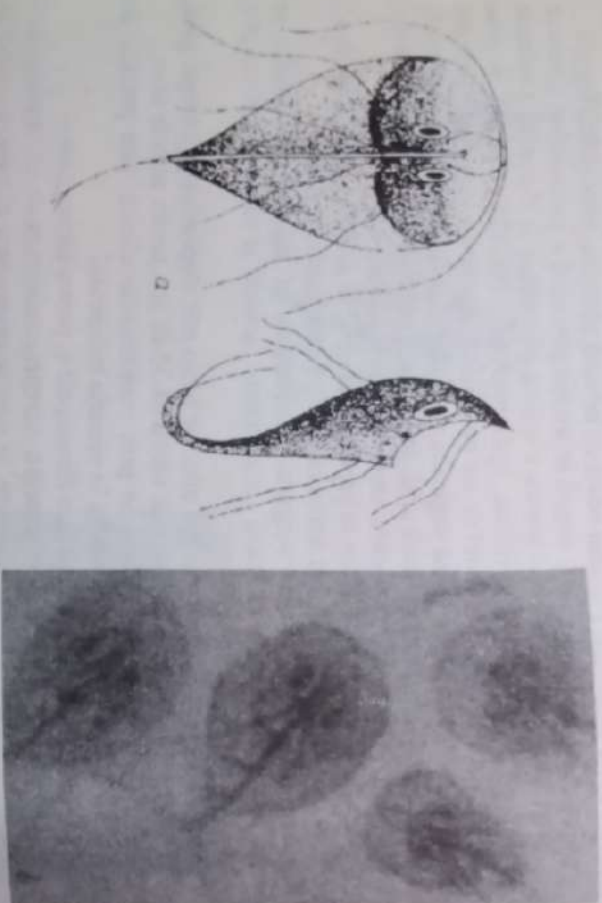


Fig. 33. *Lambliia intestinalis*:

a - reprezentare schematică; b - imagine foto.

de 8-10 μ . Această formă vegetativă a parazitului prezintă 2 nuclee mari așezate în partea anterioară a corpului și 8 blefaroplaști dispuși în 4 perechi din care pornesc aceiași număr de flageli (fig. 33 a și b). Mobilitatea parazitului este asigurată prin mișcările neconținute ale celor 4 perechi de flageli. Înmulțirea se realizează prin diviziune binară, longitudinală, atât în stadiul vegetativ, cât și după închistare, iar hrana se face prin osmoză pe întreaga suprafață a corpului parazitului.

Formele chistice, ovoidale, măsoară 10-13 μ în lungime și 7-8 μ în lățime, sunt învelite cu o membrană fină, dublă, prin transparența căreia se observă conținutul: 4 nuclee și un mănunchi de flageli care formează o dungă oblică în interiorul chistului, element caracteristic pentru identificare la examenul microscopic.

Girardioza (lambliaza)

Localizarea obișnuită a parazitului este duodenul și jejunul în al căror lumen parazitul trăiește în stadiu vegetativ. În zona ileocecală, parazitul se închistează și în această formă este eliminat odată cu fecalele purtătorului la exterior.

Formele chistice, spre deosebire de formele vegetative care se distrug repede în mediul înconjurător, sunt deosebit de rezistente, rămânând infectante, în medie, 60 de zile, iar dacă rămân constant în umereală supraviețuiesc mai multe luni. Ele sunt distruse în scurt timp la 60°C.

Patogenie. Odată pătruns în tubul digestiv al omului parazitul se multiplică rapid, ajungând la proporții de 1 milion de paraziți pe cm² de mucoasă intestinală. Împiedică buna funcționare și în special procesul obișnuit de resorbție a substanțelor nutritive. Acești paraziți pătrund și în profunzimea peretelui intestinal, provocând importante tulburări, asociind infecției cu *Lambliia* și diverse infecții microbiene. Pe lângă intestinul subțire, paraziții mai invadează desori și căile biliare.

Boala pe care o produce localizarea acestui flagelat în tubul digestiv al omului se manifestă, clinic, prin apariția unei diaree cu caracter cronic, însoțită de dureri abdominale difuze, care alternează în timp cu perioade de constipație.

Epidemiologie. Omul este cel mai important transmitător al bolii. Transmiterea se realizează atât direct prin contact cu omul bolnav, cât și indirect prin intermediul apei, al legumelor și fructelor infestare. Incubatia bolii este de 8-10 zile, iar răspândirea pe întregul glob. Frecvența mai ridicată a bolii este semnalată în colectivitățile de copii.

Diagnosticul clinic este de probabilitate, pe baza simptomatologiei clinice, iar diagnosticul de certitudine, de laborator, prin evidențierea parazitului. În fecale, în cursul examenului coproparazitologic, se evidențiază formele chistice.

De asemenea, cunoscută fiind posibilitatea contaminării directe, se mai recomandă ca la depistarea unui caz de boală să se controleze întreaga colectivitate sau familia în care a fost un caz de lambliază.

Tratamentul lambliazei se face cu preparate de tip Metronidazol și Tinidazol.

Ciclu evolutiv. Adultul se localizează la nivelul porțiunii terminale a intestinului subțire unde se și acuplează.

Femelele sunt vivipare. Ele pătrund în grosimea pereților intestinali unde vor depune larvele, lungi de 90-100 μ și groase de 6 μ . Aceste larve, urmând calea sanguină, se răspândesc în organism, sfârșind prin a se localiza, de obicei, în mușchii intercostali, masticatori, ai limbii, în mușchii globilor oculari, în regiunea din apropierea tendanelor. În acești mușchi, larva pătrunde în interiorul fibrelor musculare pe care le lezează. Rezultă o formă ovală, de 500 x 1250 μ , cu axul mare în lungul fibrelor, cu pereții stratificat, care se numește *chist de trichină* (fig. 51).

În interiorul acestui chist se găsește o larvă cilindrică, ascuțită la extremități. Aceasta fiind lungă de 1 mm, se răsucesc în spirală în interiorul chistului, de unde și numele.

Ingerarea de carne infectată de către o nouă gazdă va duce la eliberarea larvelor, care ajungând în intestin vor începe un nou ciclu biologic.

Se remarcă faptul că parazitul nu are o evoluție liberă în afara organismului, că adultii și larvele parazitează aceeași gazdă.

Trichinoza

Rolul patogen. Boala, cunoscută sub numele de *trichinoză*, prezintă mai multe perioade, corespunzătoare fazelor de evoluție a parazitului.

— Perioada I corespunde parazitoei intestinale și se caracterizează printr-un catar intestinal provocat de iritațiile mecanice ale parazitilor sau de toxinele ce se eliberează din larvele închistate. Temperatura începe să crească, pentru ca la sfârșitul primei săptămâni să ajungă la 40°C. În această perioadă intervin dureri abdominale, grețuri, vărsături, diaree.

— Perioada a II-a, de răspândire a larvelor în organism, se caracterizează prin febră în platou, dureri reumatice, edem facial și în special palpebral foarte accentuat. Boala acută, datorită localizării musculare ale larvelor, jenă la inspirație,

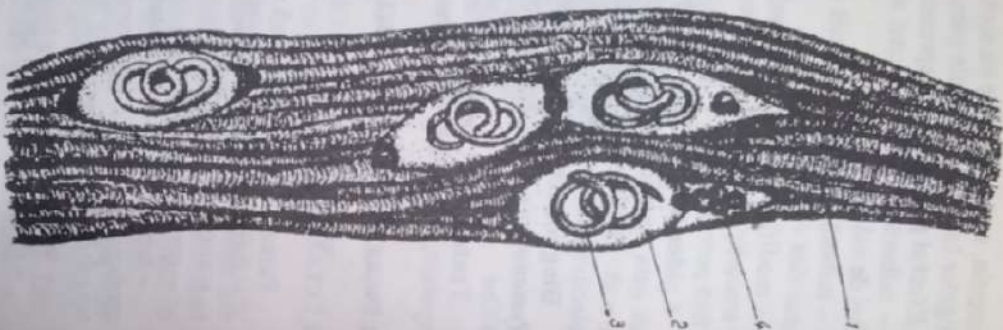


Fig. 51. Mușchi cu larve de *Trichinella spiralis*.
1 - fibră musculară; 2 - chist;
3 - larvă spiralată.

masticare, deglutiție. Din cauza acțiunii toxinelor parazitului este prezenta o stare de adinamie ce se accentuează progresiv.

— Perioada a III-a, de închistare a larvelor în mușchi, se caracterizează printr-o intoxicație din ce în ce mai marcată ce poate duce la moartea bolnavului. Dacă, însă, bolnavul rezistă până la 7-a săptămână de boală, perioada la care în grosărea pereților chistici este suficientă ca să-l izoleze de organism, atunci el poate fi socotit în afara pericolului. Fenomenele clinice cedează treptat, rămânând însă prezente pentru multă vreme durerile musculare.

În chisturile calcificate, larvele pot trăi multă vreme. S-au cunoscut cazuri în care au trăit până la 24 de ani.

Prognosticul în trichinoză este rezervat, fiind în funcție de masivitatea parazitării și rezistența individului.

Epidemiologie. Trichinoza este o zoonoză. Rolul principal de rezervor de *Trichinella* în natură îl au șobolanii care, devorându-se între ei, permanentizează acest rezervor. Cadavrele rozătoarelor parazitare, frecvent întâlnite lângă crescătoriile de porci, sunt mâncate de aceștia. Ajunse în intestinul porcului larvele se dechistează și umează ciclu evolutiv cunoscut, pentru ca, în final, să se ajungă la larvele închistate în mușchii acestuia.

Omul se îmbolnăvește consumând carne de porc infectată cu *Trichinella*, carne necontrolată prin examenul trichoscopic obligatoriu în cazul sacrificărilor de animale la abatoare sau la domiciliu și efectuat de organele sanitar-veterinare, ca și prin carne nesuspusă tratamentului termic corect, care să asigure distrugerea larvelor.

Diagnosticul de laborator. Confirmarea cazurilor se face prin teste cutanate, prin examen serologic (reacția de precipitare circumlarară), imunofluorescența și prin testul ELISA cu antigene specifice.

Tratament. Până astăzi nu există un tratament specific în această parazitoză. În faza intestinală se utilizează Piperazina și, recent, Mebendazolul sau Flubendazolul. În perioada de diseminare se folosesc cu bune rezultate tratamentul cu corticosteroizi sub protecție de antibiotice, vitaminice și calterapie cu Thiabendazol, ca medicament specific.

Profilaxie. În primul rând se vor lua măsurile necesare care să ducă la prevenirea infecțiilor porcilor. În acest sens se va duce o luptă continuă contra șobolanilor din preajma crescătoriilor de porci, prin deratizări sistematice, cu strângerea și incinerarea tuturor cadavrelor.

Va fi interzisă consumarea cărnii de porc provenită din tăieri clandestine. Orice tăiere, chiar în afara abatorului, va fi obligatoriu controlată de organele sanitar-veterinare prin examen trichoscopic. Carnea consumată va fi bine fiartă.

Trichocephalus dispar

Trichocephalus dispar sau *Trichiuris trichiura* este un nematod de mărime medie, cu extremitatea anterioară foarte subțire și cu cea posterioară mai groasă.

ales, după mișcările ce duc la contact cu solul. Fructele și zarzavaturile nu vor fi consumate decât după spălare la un curent de apă și înmuiere în apă fiartă.

Diagnosticul de laborator. Se va face prin punerea în evidență a ouălor în materiile fecale la examenul direct, sau utilizând metode de concentrare.

2.1.2. Familia Ascarididae

Ascaris lumbricoides

Ascaridul este un nematod de culoare albă-gălbui, uneori roz, cu capetele ascuțite. Este cel mai lung vierme cilindric al omului.

Masculul măsoară 15-20 cm lungime, iar femela 20-25 cm. La extremitatea anterioară prezintă orificiul bucal înconjurat de trei buze proeminente și dințate. Extremitatea posterioară a parazitului este dreaptă la femelă și recurbată în formă de cârjă la mascul.

Are un tub digestiv complet, reprezentat de un esofăg de tip strongiloid, care se deschide într-un intestin ce se desfașoară pe axul corpului spre extremitatea posterioară, unde dilatăndu-se formează rectul. Acesta se deschide prin orificiul anal, care este situat subterminal, la mascul în concavitatea cărjei (fig. 54).

Ciclu evolutiv. Femela depune zilnic 200 000 de ouă ovale, galbene-brune, de 60-75x40-60 μ , cu un înveliș dublu, unul extern de natură albuminoasă, mai gros, cu aspect mamelonat, caracteristic, și unul chitinos.

Aceste ouă nu sunt embrionate în momentul eliminării (fig. 55, a).

În mediul extern ouăle fecundate (fig. 55, b) se vor embriona, în funcție de temperatură și umiditate, într-o perioadă de 10-40 de zile.

În interiorul oului embrionar ia naștere o larvă cu aspect vermiform, de 250 μ , mobilă. Larva năpârsește în interiorul oului, și din acest moment oul devine infectant pentru om.

Ingerat de om odată cu alimentele, în general cu fructe sau zarzavaturi nespălate sau cu apa, ajunge în intestinul acestuia, unde sub influența sucurilor intestinale, își pierde învelișurile și se pune astfel în libertate larva (fig. 56, a).

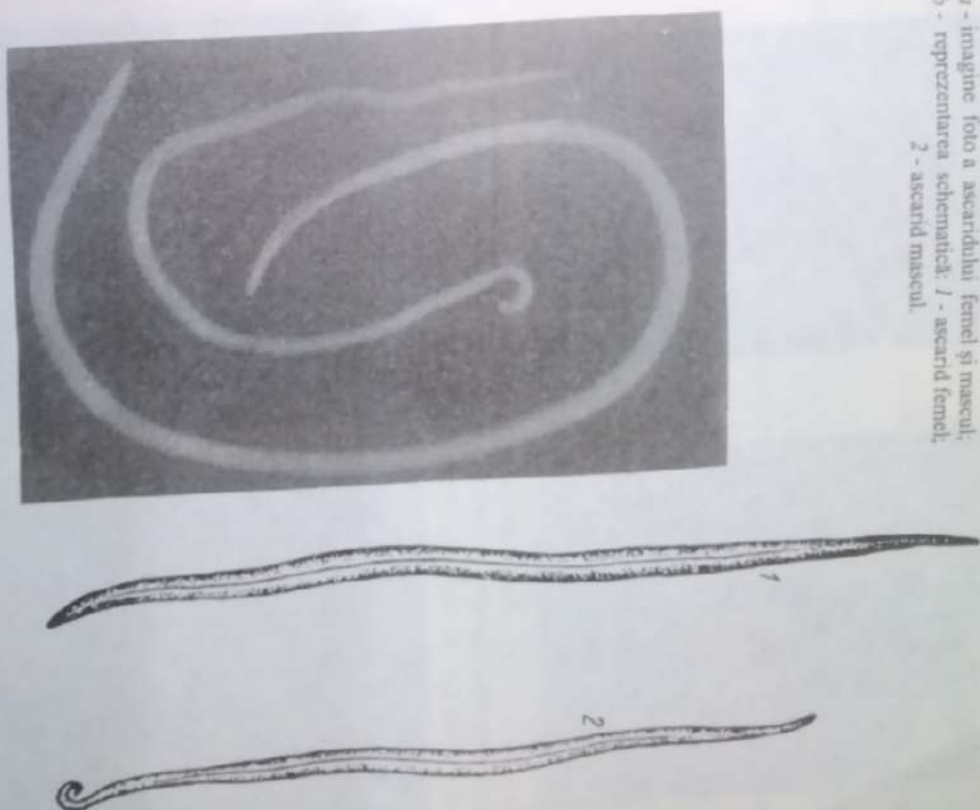
Larva, nefiind adaptată condițiilor pe care i le oferă cavitatea intestinală, străbate perețele intestinal și, pe calea venei porte, ajunge la ficat, unde, rămânând timp de aproximativ 4 zile, și crește până la 400 μ (fig. 56, b).

Prin venele suprahepatice larva trece în vena cavă și apoi prin mica circulație ajunge la nivelul capilarilor alveolelor pulmonare unde face un alt popas de 5-7 zile. Aici continuă să crească, ajungând la 1 000 μ .

Larva perforază perețele alveolei și ajunge în lumenul ei. Cu ajutorul cililor vibrații ai celulelor epiteliale ce tapetează arborele respirator, larvele ajung în cavitatea bucală. Unele din ele sunt eliminate cu sputa, iar altele, înghițite, ajung din nou în intestin.

Drumul acesta este cunoscut sub numele de *ciclu perienteric*.

Fig. 54. *Ascaris lumbricoides*:
a - imagine foto a ascaridului femel și mascul;
b - reprezentarea schematică: 1 - ascarid femel;
2 - ascarid mascul.



În intestinul subțire, larvele devenite adulte se vor acupla. După 2-3 luni, femelele vor începe să depună ouă.

Rolul patogen. Boala, numită *ascaridoză*, se face cunoscută printr-o serie de tulburări clinice caracteristice celei două faze: larvară și adultă.

În prima fază, când are loc trecerea larvelor prin plămâni, se declanșează o pneumonie "ascaridiană" a cărei gravitate este în funcție de numărul parazitilor.



Fig. 55. *Ouă de Ascaris lumbricooides*:
a - ou fecundat, dar neembrionat; b - ou fecundat embrionat - infectant.



Fig. 56. Larve de *Ascaris lumbricooides*:
a - eclouzate la nivelul intestinului; b - în ficat de om.

În faza a doua, intestinală, sunt caracteristice durerile abdominale, însoțite de greață, slăbire, balonări, modificări de apetit, tulburări de tranzit, cefalee, amețeli, prurit nazal și anal, anemie.

Epidemiologie. Omul purtător de ascariizi este singurul rezervor al ascariozei umane.

Prin ouăle eliminate cu materiile fecale, parazitoză este răspândită în mediul înconjurător, defecarea pe sol reprezentând cel mai important moment al poluării lui.

Contagiunea directă nu este posibilă, numai cea mediată prin sol. Boala are frecvență ridicată în zonele tropicale, subtropicale și cu climă temperată. Incidența este mai ridicată la copii.

Tratament. Piperazina este medicamentul cel mai înțebuniat în țara noastră, alături de Levamisol (Decaris) sau Mebendazol (Vermox).

Profilaxie. Având în vedere rezistența ouălor de ascariizi în mediul extern și numărul mare al acestora în materiile fecale, se impune ca primă măsură de profilaxie folosirea de closete igienice și inactivarea deieciilor bolnavului cu apă fierbinte. Fecalele vor fi folosite la îngășarea terenurilor după compostare cu gunoi menajer.

Se va duce o intensă activitate de educație sanitară pentru a arăta moduli de infectare, necesitatea spălării mâinilor murdare, necesitatea spălării cu apă curată și apoi clocotită, înainte de consum, a fructelor și zarzavaturilor care se consumă crude și în special a celor care au fost cultivate pe terenuri irigate sau îngășate cu reziduuri fecaloide.

Diagnosticul de laborator. Se va face examenul microscopic al materiilor fecale prin una din metodele de concentrare. Ouăle vor fi ușor recunoscute datorită caracterelor morfologice.

2.1.3. Familia Oxyuridae

Oxyuris vermicularis

Oxiurul este un nematod mic. Femela măsoară până la 1 cm. Extremitatea posterioară este subțire, ascuțită și dreaptă (fig. 57, a, 2), spre deosebire de mascul, de numai 0,3-0,5 cm și la care extremitatea posterioară este curbă în formă de cârjă (fig. 57, b, 2).

Ciclu evolutiv. Oxiurul trăiește ca adult în cecum. El este singurul vierme cilindric la care femela nu depune ouăle pe măsură ce acestea se formează, ci le reține pe toate în uter, care se dilată considerabil. O femelă conține în jur de 10 000 de ouă.

Ouăle au formă ovală, asimetrică, cu o față plană și una convexă, având dimensiuni cuprinse între 50-55x20-25 μ. Culoarea este albă, ușor cenușie, transparentă.

Ouăle embrionează în uter. Embrionul, cu o porțiune ovoïdă mare și o coadă recurbată, seamănă cu un mormoloc de broască și, de aceea, se numește *embryon giriniform*.

În momentul în care toate ouăle au fost embrionate, femela se îndreaptă către orificiul anal și depune în jurul orificiului și în plinile anale toate ouăle.

Migrarea către orificiul anal se face, de obicei, seara, când bolnavul se culcă, și se caracterizează printr-un prurit anal și perianal greu de suportat.

După depunerea ouălor, femela moare în câteva minute. Embrioul giriniform se transformă într-un interval de câteva ore într-o larvă verniformă, lungă de 140 μ , care se îndoaie în interiorul oului. Din acest moment oul devine infectant.

Introdusă din nou în tubul intestinal, prin intermediul mâinilor nespălate, larva va fi eliberată sub acțiunea sucurilor gastrice și, continuându-și drumul, se va dezvolta în prima parte a intestinului subțire, unde adulții se acuplează și trec apoi în colon, reluând astfel ciclul.

Rolul patogen. Pe lângă durerile abdominale și tulburările de tranzit caracteristice enterocoliciei provocate de iritația locală, întâlnim grețuri și todeauna pruritul anal chinuitor, provocat de mobilizarea paraziților în această regiune. Ca o consecință a acestui prurit sunt prezente tulburări neuroase, bolnavii neputându-se odihni.

Trebuie semnalat în mod deosebit rolul acestui parazit în provocarea apendicitei.

Epidemiologie. Sursa de infecție este reprezentată de omul bolnav.

Ouăle, depuse în regiunea perianală și care în câteva ore devin infectante, sunt luate în timpul grătajului pe mâini și în special sub unghii și apoi introduse în gură, sau pe alimente, de copiii care își sug degetele sau nu se spală pe mâini înainte de a mânca (transmisie directă).

Boala este răspândită pe întregul glob, cu frecvență mai ridicată în colectivitățile de copii.

Diagnosticul de laborator. De cele mai multe ori, bolnavul recoltează paraziți de pe suprafața bolului fecal și atunci identificarea este făcută macro- și în special microscopic.

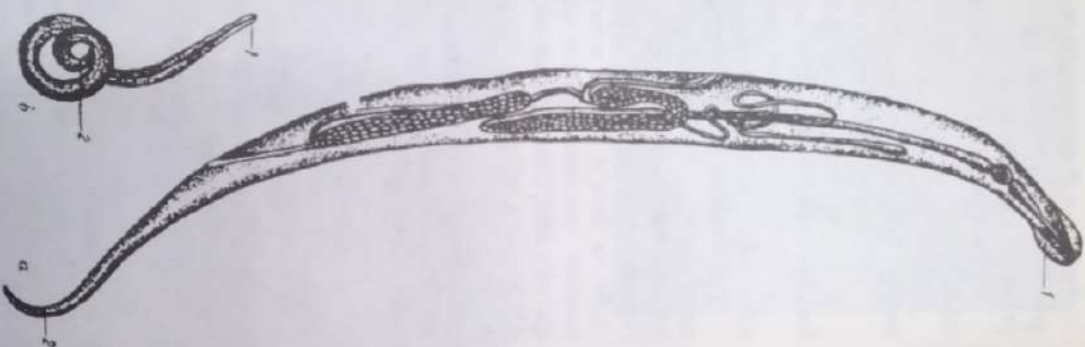


Fig. 57. *Oxiur*.
a - femelă; b - mascul;
1 - extremitatea anterioară;
2 - extremitatea posterioară.

Examenul coprologic, chiar cele prin metode de concentrare, dau adesea rezultate negative, întrucât femela, nedepunând ouă în cavitatea intestinală, acestea nu vor fi găsite decât excepțional, prin strivirea unei femele, la aceste examene. Pentru a avea rezultate pozitive, va trebui să dăm atenție locului unde aceste ouă sunt depuse - pliurile perianale.

Ouăle vor fi recoltate din acest loc cu o baghetă de sticlă al cărei capăt se înveleşte în într-o foaie de celofan, fie cu o peliclă de colodiu.

În laborator foaia sau colodul se secționează, se întinde pe o lamă și se transformă într-un preparat proaspăt cu ajutorul unei picături de glicerină și a unei lamele. Preparatul se examinează la microscop.

Tratament. Oxiuroza se poate trata cu derivați de piperazină (Nemastocron), cu pamoat de pirvinu (Vermigal), cu pamoat de pyrantel (Combairin) sau cu Mebendazol (Vermox), asociate cu tratament local al regiunii perianale.

Profilaxie. Lupa va fi încununată de succes dacă, ținând seama de marea contagiozitate, odată cu tratarea bolnavului vor fi tratați toți membrii familiei.

Bolnavul va fi instruit să respecte regulile de igienă personală, pentru a împiedica atât răspândirea, cât și autoinfestarea.

2.1.4. Familia Ankylostomidae

Ankylostoma duodenale

Ankylostoma duodenale este un nematod mic, care prezintă la partea anterioară o formațiune ovală, chitinoasă, *capsula bucală*, cu care paraziții se prinde de mucoasa intestinală.

Masculul măsoară până la 1 cm. Prezintă la partea posterioară punga copulatoare (fig. 58, b, 2).

Femela, mai lungă, având până la 3 cm, se termină posterior cu un vârf ascuțit (fig. 58, a, 2).

Cicla evolutiv. *Ankylostoma duodenale* se localizează în duoden și în porțiunea inițială a jejunului.

Acuplarea paraziților are loc în intestin și durează mai multe zile.

O femelă poate depune în 24 h până la 10 000 de ouă. Acestea sunt eliminate în intestin, pe rând, și de aici în mediul extern odată cu materiile fecale. Au o formă ovalară, un înveliș simplu și subțire, culoare albă-transparență și măsoară 60x40 μ .

În interiorul oului se distinge un început de segmentare sub forma a 2-8 blastomere (fig. 58, c, 2).

În intestinul gazdei, din cauza unor condiții nefavorabile reprezentate de temperatura prea ridicată, lipsa de oxigen și existența unor gaze, segmentarea nu poate continua.

Numai mediul extern poate oferi oului condițiile necesare dezvoltării: temperatură

Cap. XXXI. MICOLOGIE

1. NOȚIUNI GENERALE

Micozele sunt boli provocate de ciuperci parazite (paraziți criptogamici sau paraziți micotici), iar **micologia** este știința care se ocupă cu studiul acestor ciuperci și cu tulburările pe care le produce în organismul invadat.

Micozele sunt răspândite pe întreaga suprafață a globului pământesc, însă distribuția diferitelor specii este, în general, limitată la anumite regiuni.

Între microorganisme ciupercile formează un grup aparte, cu caracteristici care le fac să ocupe un loc special, insuficient precizat.

1.1. MORFOLOGIA

În general, orice ciupercă tipică este formată din două părți distincte:

– o parte vegetativă, numită **tal**, care asigură creșterea ciupercii, alcătuită din **filamente micelene** sau **hife**, mai mult sau mai puțin lungi, adesea anastomozate între ele, care nu sunt altceva decât celule cu un conținut protoplasmic variabil și cu o membrană rezistentă care se dezvoltă în toate sensurile;

– o parte de rezistență și reproducere, denumită **spor**, care ia naștere din tal și este reprezentată de elemente de formă dreptunghiulară sau rotunjită, de mărime variabilă (fig. 73).

1.2. ÎNMULȚIREA

Reproducerea și răspândirea la ciuperci se pot face, în general, după două mari tipuri:

– **înmulțirea perfectă** (sexuată) reprezintă tipul de înmulțire în care două elemente sexuate se vor contopi dând naștere la **ou** (zigot) sau **ascospor**;

– **înmulțirea imperfectă** (asexuată) este realizată atunci când sporul se va forma pe un filament micelian direct, fără un proces prealabil de conjugare. Sporangiosporul, conidia, artrosporul și blastosporul reprezintă tipuri de spori realizați prin înmulțire imperfectă.

1.3. NUTRIȚIA

Ciupercile, fiind lipsite de clorofilă, nu pot descompune dioxidul de carbon pentru a extrage carbonul necesar sintetizării substanțelor nutritive. Din acest motiv, ele ori sunt legate de un substrat organic în descompunere pe care se dezvoltă (saprofite), ori trăiesc pe substanțe vii pe seama cărora se hrănesc (parazite).

Deseori, ele produc fermenți ce pătrund în mediul în care se dezvoltă, transformând substanțele din mediu în elemente nutritive pe care le vor absorbi în protoplasma lor. Întrucat, așa cum s-a arătat, ciupercile sunt lipsite de clorofilă, ele nu au nevoie de

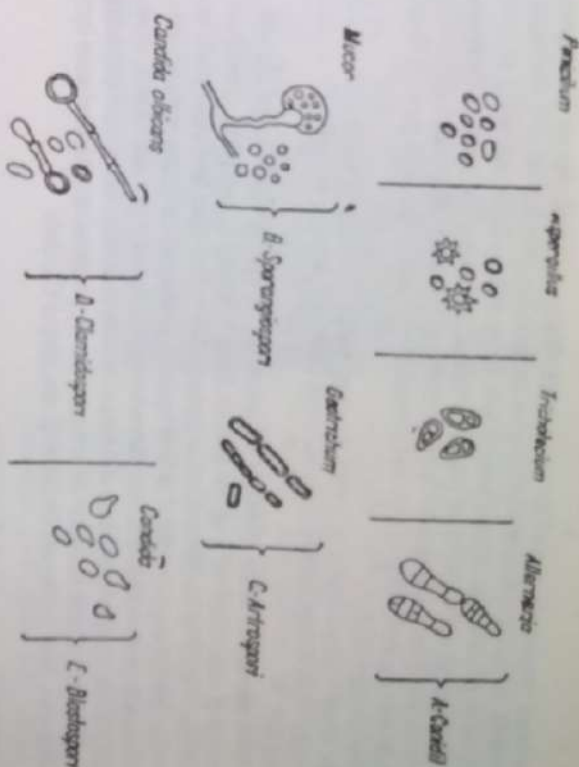


Fig. 73. Diferite tipuri de spori.

lumina pentru a se dezvolta. Acest fapt le ușurează viața parazitară, deoarece le permite să trăiască și în profunzimea țesutului gazdei.

1.4. TOXINELE

Ciupercile parazite produc substanțe care sunt, în general, toxice pentru organismul pe seama căruia se dezvoltă. Unele substanțe toxice, numite toxine, difuzează din corpul parazitului în corpul gazdei în timpul vieții parazitului (exotoxine), în timp ce altele rămân localizate în protoplasma ciupercii și sunt puse în libertate numai după distrugerea ei (endotoxine).

Dintre aceste substanțe sunt și unele care pot fi folosite omului. Astfel, unele ciuperci neputătoare produc în mediu în care se dezvoltă substanțe care opresc dezvoltarea unor bacterii patogene. Aceste substanțe sunt **antibiotice**, și exemplul clasic este reprezentat de ciupercile din genul **Penicillium** din care se extrage **penicilina**.

1.5. ROLUL PATOGEN AL CIUPERCILOR

Odată pătrunse în organismul unei gazde, ciupercile își manifestă acțiunea lor vătămătoare în felurile modalității.

Astfel, de exemplu, o ciupercă din genul **Aspergillus** pătrunsă în căile respiratorii

va acoperi mucoasele bronhiilor cu o rețea fină – miceliul. Se va bloca, astfel, funcțional suprafața destinată schimburilor gazoase, iar prin dezvoltarea sa exagerată parazitul va putea astupa chiar și bronhiolele. La această *acțiune mecanică* se adaugă *acțiunea toxică*, reprezentată de iritația și inflamația țesuturilor produse de toxinele pe care le eliberează ciupercă în timpul creșterii și o *acțiune necrotică*, reprezentată de distrugerea țesuturilor prin acțiunea fermenților pe care parazitul îi pune în libertate la locul de dezvoltare.

În raport cu localizarea în corpul omenească, bolile pe care le produce ciupercile – micozele – pot fi împărțite în alte două mari categorii: micoze superficiale și micoze profunde.

Micozele superficiale afectează cu precădere straturile superficiale ale pielii și fanerelor și reprezintă un grup de boli cu largă răspândire, ocupând primul loc în micologie. Faptul că ele se localizează aproape în exclusivitate la nivelul pielii sau al fanerelor (peri și unghii) a făcut să li se atribuie și denumirea de *dermatomicoze*.

Micozele profunde sunt acelea care afectează țesutul celular subcutanat, mușchii, oasele și chiar viscerele, dar care din punct de vedere al răspândirii sunt cu mult mai puțin frecvent întâlnite în raport cu primele. Tot în grupa micozelor profunde intră și candidozele – boli provocate de ciuperci din grupul *Candida*.

2. TRICOFIȚIA

Tricofiția este o boală parazitară produsă de ciuperci parazite din familia *trichofitonilor* (*Trichophyton violaceum*, *Trichophyton crateriformis*, *Trichophyton gypseum* ș.a.). Acestea se localizează fie pe pielea capului, dând leziuni uscate numite *tondanta tricoftică*, fie în baba adulților, provocând leziuni izolate de foliculită supurantă, numite *siccozis tricoftic*, *foliculă confluentă* sau *kerionul bărbii*.

Pe restul pielii corpului tricoftionii realizează leziuni cu caracter eritematos, cunoscute sub numele de *herpesul circinat*, iar la unghii apar leziuni cunoscute sub numele de *onicomicoză tricoftică*.

Dintre toate formele, tricoftia uscată – *tondanta tricoftică* – este afecțiunea cea mai frecventă și cea mai contagioasă. Apare în timpul copilăriei, numai până la vârsta de 15-16 ani, după care, de regulă, se vindecă spontan, nepersistând decât în rare cazuri la adulți. Celelalte forme sunt mai frecvente la adulți și necesită un tratament medical susținut.

Epidemiologie. Sursa de infecție în această boală parazitară este reprezentată de om, ca și de o serie de animale (căine, pisică, cal, vacă, șoarece) de la care omul sănătos se poate îmbolnăvi prin scuame, fragmente de păr sau de unghii, ca și prin secrețiile leziunilor supurative. Unele specii de tricoftioni au o rezistență mare la condițiile de mediu înconjurător, rezistând ani de zile în scuame, peri sau croțe, care apoi pot infecta omul sănătos. Din această cauză infecția, pe lângă *transmisivitatea directă*, se mai poate realiza și *indirect*, prin diverse obiecte contaminate (căciuli, șepci, pălării, bascuri, piepteni, instrumente de frizerie, lenjerie de corp, de pat etc.).



Fig. 74. Tricoftie

Diagnosticul bolii se face *clinic*, după simptomatologia arată și cu ajutorul *laboratorului*, prin examenul perilor sau al scuamelor recoltate din leziuni. Pentru acest din urmă diagnostic, perii și scuamele, recoltate din placardul lezional, cu ajutorul unei spatule sterile, sunt plasați într-o soluție de potasă caustică 40% sau lactofenol și, prin examen la microscop, se evidențiază prezența parazitului.

Specia de parazit se determină prin cultură.

Tratamentul diferă în raport cu localizarea.

– În localizările pe pielea capului, tratamentul constă în roentgenoplică, urmată de badijonări cu alcool iodat și salicilat de sodiu până la creșterea părului. Se mai pot utiliza griseofulvina, griseofulvina M și clotrimazolul.

– Localizările pe pielea glabră sunt tratate cu badijonări cu alcool iodat și salicilat de sodiu sau cu coloranți de tipul violetului de gențiană.

Profilaxia și combaterea bolii se bazează pe depistarea și tratamentul imediat al formelor incipiente de boală, controlul copiilor la primărie în colectivitate și controlul lor periodic. Rușina de pat și corp, hainele, pălăriile, căciulițele, obiectele de toaletă ale bolnavilor vor fi dezinfectate riguros, iar în frizerii se va introduce dezinfecția corectă a instrumentelor și a părului tuns.

3. FAVUSUL

Favusul este o boală parazitară produsă de *Achorion schoenleinii*, care se dezvoltă în profunzimea pielii capului, distrugând firul de păr. Boala netratată persistă foarte

Aspectul clinic al bolii deosebește tricoftia uscată de tricoftia inflamatorie. – **Tricoftia uscată**. În această boală, suprafața pielii este presărată cu leziuni ovale sau rotunde, de 0,5-4 cm diametru, în număr variabil, izolate sau confluențe, acoperite cu scuame uscate sau gras.

Peri sunt friabili, majoritatea rupti la 1-2 mm de la emergența lor, iar alții îndoiți. Pe placardul lezional se pot observa și rare fire de păr intacte (fig. 74).

– **Tricoftia inflamatorie**. Boala de origine animală, se localizează pe pielea capului sau a feței în regiunile acoperite cu păr. Se prezintă uneori sub forma unui placard unic, de obicei rotund, ușor proeminent, presărat cu pustule foliculare, cu marginile bine delimitate și oarecum în pană, cu un diametru de 1-5 cm și numai rareori mai mare.

6. CANDIDOZA ȘI ACTINOMICKOZA

În afară de micozele cutanate superficiale se mai întâlnesc la noi în țară și unele micoze profunde, cu sediul în derm și hipoderm, sau alte micoze ale mucoaselor. Acestea, spre deosebire de micozele superficiale, constituie un grup de afecțiuni cu un prognostic mai grav. Dintre aceste micoze, mai frecvent întâlnite sunt *candidoza* și *actinomicoza*.

6.1. CANDIDOZA

Acesta este o boală parazitată produsă prin localizarea unei ciuperci, *Candida albicans*, mai frecvent pe mucoasa bucală sau pe alte mucoase, realizând infecția cunoscută sub numele de "mărgăritare".

Parazitul se prezintă sub forma unui înveliș membranos, alb sau cenușiu, care acoperă treptat mucoasa gurii, a faringelui, a esofagului. Această falsă membrană, groasă de 1-2 mm, nu aderă în profunzimea straturilor mucoasei de care se detașează cu ușurință.

La examenul microscopic, această falsă membrană apare formată din filamente cilindrice, simple sau ramificate, de 3-5 μ lățime și 50-600 μ lungime, formate din celule așezate cap la cap. Între aceste filamente miceliene, sau la extremitatea unora dintre ele, se observă celule sferice sau ovoide de 5-7 μ diametru, foarte refringente, care sunt clamidosporii caracteristici genului *Candida*.

Epidemiologie. Transmiterea bolii se face direct de la omul bolnav la omul sănătos, prin intermediul veselei, sau de la unele animale infestate, în special bovine. Boala este răspândită pe întreaga suprafață a globului, apariția ei fiind favorizată de factorul "teren" reprezentat de antibioterapie intensă, atrepsie.

Aspectul clinic este reprezentat de o stomatită la început eritematoasă, pentru ca în următoarele 3-4 zile să se observe prezența unor depozite albicioase, la baza limbii, apoi pe mucoasa obrazului, bolta palatină și gingii, numită și *mărgăritare* sau *muguet*.

Tratamentele cu antibiotice creează un teren favorabil dezvoltării acestei ciuperci, care poate fi în aceste cazuri generalizată, invadând întregul organism. Localizările cele mai frecvente sunt în tubul digestiv, vagin și aparatul respirator, în mod special în plămâni.

Diagnosticul se face în laborator, evidențiind parazitul din falsele mucoase sau zone perlate, prin examen microscopic direct sau prin culturi pe medii specifice.

Tratamentul bolii se face prin spălturi cu substanțe alcaline, ținând seama că ciuperca se dezvoltă în mediu acid, badijonări cu glicerină boraxată, antifungice de tip Micostatin, Nipafungin, Stamincin sau Amphotericin ori 5-Fluorocitozin.

Prevenirea bolii se face evitând contactul cu persoanele infectate și acordând o atenție deosebită în aplicarea tratamentelor prelungite cu antibiotice.



Fig. 78. Actinomicoza cervicală.



Fig. 79. Pictor cu micetom.

6.2. ACTINOMICKOZA

Actinomicoza este o boală parazitată dată de localizarea în pielea regiunii cervicofaciale, a mâinii, a piciorului, a unei ciuperci din genul *Actinomyces*.

Parazitul izolat din leziuni se prezintă sub forma unor mici granulați de aspect și culoare variabilă, galbenă-albă, formate central dintr-un miceliu fin și des ce se întrete în toate direcțiile. La periferie prezintă o coroană de elemente dilatate, așezate radial, care nu sunt altceva decât o hipertrofiă a hifelor miceliene.

Ciuperca trăiește saprofită în pământ, în apă, dar mai ales pe vegetale: grâu, cereale, frunze, fructe în putrefacție etc.

Formele clinice, mai frecvent cutanate, provocate de acest parazit, sunt reprezentate de localizările în regiunea cervicofacială sau la mâini și picioare, unde iau numele de "mâna sau piciorul de Madura".

Actinomicoza cutanată cervicofacială (fig. 78) este caracterizată prin prezența unor noduloiziți cu sediul în hipoderm, de mărime variabilă (gâmbă de ac - nucă), mobile pe planurile profunde, care cu timpul se agravează, dând naștere unor ulcerații din ce în ce mai mari, cu margini dezlipite și suprafața vegetantă. Starea generală a bolnavului nu este alterată decât în forme avansate de boală.

Pictorul și mâna de Madura (micetom - fig. 79) reprezintă o afecțiune rar întâlnită în țara noastră, fiind mai frecventă în țările calde. Este caracterizată prin

aparitia unor nodozitati multiple, care se extind in placarde de aspect tumoral, ulcerase si dureroase la presiune.

Epidemiologie. Transmiterea la om se face prin:

- patrunderea directa in piele a parazitului la nivelul unei mici solutii de continuitate (zgarieturi), mai ales la picioarele persoanelor care umbla desculte;
- prin infectarea mucoasei bucale faringiene, in urma mestecării grăunțelor de cereale parazitare;

- prin introducerea parazitului in tubul digestiv odata cu alimentele infectate, de unde, pornind prin mucoasa intestinala lezata, va determina pe cale sanguina metastaze viscerale, osoase sau cutanate.

Diagnosticul este precizat in laborator, evidentind prezenta parazitului in produsele recoltate din zonele ulcerate sau prin biopsia nodurilor.

Tratamentul se face: *general*, prin administrare de iodură de potasiu, preparate arsenobenzenice, vaccin antiactinomicotic, antifungice de tip Amphoterin, 5-Fluorociozin sau Clotrimazol si *local*, prin electroterapie.

Prevenirea bolii consta in evitarea infectiei din sol, in special pentru agricultori, evitarea consumării de alimente - fructe insuficient spalate, igiena personala si diagnosticul precoce al elementelor nodulare ale pielii.

Lucrări Practice

Examenul parazitologic al materiilor fecale

In diagnosticul celor mai multe parazitoze, analiza materiilor fecale constituie examenul de laborator hotarator.

Recoltarea probelor fecale trebuie insa sa se faca corect si cu respectarea conditiilor speciale, reclamate de parazitii a carui prezenta este banuita de medic, intrucat rezultatul analizei depinde in foarte mare masura de acest moment.

Parazitii studiati de noi si care pot fi identificati in materiile fecale sunt:

Protozoare:	Entamoeba histolytica	Plathelminți:	Fasciola hepatica
	Giardia intestinalis		Taenia saginata
	Trichomonas intestinalis		Taenia solium
	Balantidium coli		Hymenolepis nana
			Diphyllobothrium latum
Nemathelminți:	Trichiuris trichiura	Entorobius vermicularis	
	Ascaris lumbricoides	Strongyloides stecoralis	
		Ankylostoma duodenale	

Atunci când se pune problema identificării unor paraziti întregi, cum este cazul ascaridului sau al fragmentelor de paraziti (cazul teniilor), probele vor fi aduse in laborator in vase de sticla, de dorit borcane largi, continand apa slab sarata, solutie de formalina sau chiar apa simpla.

Materiile fecale vor fi recoltate in cutii de sticla, de plastic sau bachelita si in nici un caz (se mai obișnuiesc încă) in cutii de carton sau de chibrituri in care materialul, ce poate fi infectios sau infectat, difuzează in exterior ori se usucă si nu mai poate fi examinat.

Proba va fi recoltată din diferite locuri ale scaunului, care nu trebuie să conțină urme de urină.

Pentru cercetarea amibelor, de multe ori este nevoie ca proba de examinat să fie adusă in laborator in cel mult 4 ore de la recoltare.

Inainte de a trece la prezentarea metodei de lucru propriu-zise, trebuie avut in vedere faptul că toată sticlăria care se întrebuințează: cristalizoare, tuburi de centrifugă, perle, flacoane, baghete etc., trebuie păstrată in permanență in amestec sulfocromic. Altfel ouăle, care sunt foarte aderente, pot rămâne pe această sticlărie, de la o analiză la alta, ducând astfel la rezultate eronate.

In momentul întrebuințării, sticlăria va fi bine spălată cu apă curentă.

Tehnica de lucru. In primul rând, proba de fecale va fi examinată din punct de vedere macroscopic. Acest examen se face după ce fecalele au fost transvazate într-un

cristalizor sau cutie Pétri, mai întinsă, cu ochiul liber, cu lupa pe fond alb sau negru, ajungându-ne de o baghetă.

În felul acesta se pot pune în evidență, în cazul paraziților mari, paraziți întregi sau fragmente, mucozități, striuri sanguine etc.

Fecalele se diluează apoi cu ser fiziologic, se omogenizează, se decantează supernatantul de câteva ori și apoi se examinează sedimentul în care putem identifica paraziții mici.

Se trece apoi la examenul microscopic, care se poate efectua printr-o serie de metode directe și de concentrare.

Metodele directe cuprind următoarele operații:

— Examenul direct între lamă și lamelă a unor mici cantități de fecale, recoltate din diferite puncte, la microscop cu obiectiv 3 și 7. Stratul trebuie să fie foarte subțire. Metoda aceasta este întrebuintată în special în cazul scaunelor mucosanguinolente sau diareice.

— Examenul după diluare cu ser fiziologic. Prin această metodă izolăm mai mult elementele și facem preparatul mai transparent, și deci mai favorabil examinării.

— Examenul după diluare cu Lugol forte (1 g iod metaloizid și 2 g de iodură de potasiu în 100 ml apă distilată) este folosit mai ales dacă este vorba de chisturi de protozoare. Soluția iodoiodurată face mai refringente, mai ușor vizibile, unele organisme ale parazitului, care apar cu această metodă foarte clare, permițându-se diagnosticul diferențial între chistul de *Entamoeba coli* și *E. dysenteriae* etc.

Metodele de concentrare se întrebuintează în special când numărul elementelor parazitare este mic și când celelalte tentative de diagnostic au rămas negative.

Metoda Telemann-Langeron. Se procedează astfel:

- o mică cantitate de fecale se omogenizează cu puțin ser fiziologic și se introduce într-o sticlă cu dop șlefuit cu capacitatea de 50 ml;
- se introduc câteva perle de sticlă și 10 ml acid clorhidric 50%;
- se astupă sticla cu dopul și se agită câteva minute, manual sau cu un agitator, pentru omogenizarea și dizolvarea substanțelor proteice, fosfaților, mucinei, diverselor săpunuri etc.;

— se adaugă o cantitate de 10 ml eter sulfuric și se agită din nou 4-5 min, având grijă să astupăm dopul flaconului cu o cârpă sau plastic, întrucât poate sări sub acțiunea vaporilor de eter, eterul va dizolva grăsimile;

— se scoate cu atenție dopul și amestecul este trecut în două tuburi de centrifugă, care, după ce se echilibrează bine, sunt centrifugate 10 min la 500 rot/min.

Prin centrifugare, amestecul se separă în patru straturi. În ultimul, cel de la fund, se găsește eventualele elemente parazitare. Numai acestea interesează. Se ajunge la acest strat după ce, cu grijă, cu ajutorul unei pipete Pasteur, s-au desprins de pe pereții eprubetei primele trei straturi și s-au îndepărtat printr-o întoarcere bruscă a eprubetei.

Depozitul rămas este pipetat și etalat pe mai multe lame, care acoperite cu lamelae vor fi examinate cât mai repede la microscop. Metoda dă rezultate pentru ouăle mai grele ale helmintilor și pentru cele operculate.

Metoda Willis-Fülleborn are drept scop concentrarea ouălor prin metoda hidrostatică și se procedează astfel:

— o cantitate de fecale, de mărimea unei alune, este trecută într-un capac de pahar Borelli;

— se toarnă puțină soluție suprasaturată de NaCl sau sulfat de magneziu și se omogenizează bine cu baghetă;

— se continuă cu adăugarea soluției, agitându-se permanent până ce capacul se umple aproape până sus;

— desupra lichidului se aplică cu grijă o lamelă, după care se lasă în repaus 30 min, după aceasta, cu o pensă, se ridică lamela cu atenție, brusc, și se pune pe o lamă.

Atragem atenția că timpul nu trebuie depășit, întrucât unele ouă se înhiba și cad la fund, ca cele operculate.

Metoda pune în evidență în special ouăle ușoare. Nu este o metodă ideală, însă, având în vedere faptul că este simplă și ușoară, poate fi întrebuintată cu rezultate bune în examinări repetate și mai ales atunci când este completată cu metoda Telemann-Langeron.

Clarificarea proglotelor de cestode se face în 14-20 h cu glicerina acetică, după ce în prealabil au fost fixate prin păstrare în alcool de 96°, timp de 8-14 h. Pesa devine complet transparentă.

În cazul oxinurozei este bine să se trimită spre analiză produsul prelevat din plinuri anale, cu ajutorul unei baghete coloidonate sau prevăzute cu celofan.

Recoltarea materialului patologic și examenul micologic

Recoltarea materialului patologic pentru diagnosticul micozelor se face prelevând materialul de răclaj al mucoaselor, spută, aspirat bronșic, urină, fecale, puroi sau sânge, care apoi sunt examinate cu precizarea diagnosticului. Pentru fiecare din aceste produse, recoltarea se face direct. Astfel:

Secreția și alte produse patologice din cavitatea bucală sau vaginală, ca false membrane, puroi etc., se recoltează răclind mucoasa cu o spatulă sau valvă vaginală sterilă, sau cu o ansă sterilă. Produsul astfel recoltat se introduce în eprubete sterile cu ser fiziologic steril, pentru a evita uscarea lui.

Sputa se recoltează timp de trei zile consecutiv, de trei ori pe zi, în pahare sterile, după o gargară prealabilă cu ser fiziologic steril. Deschiderea și închiderea paharelor se face cu rapiditate, pentru a preveni infectarea cu fungi din mediul înconjurător.

Aspiratele bronșice sunt cele mai concludente și mai indicate datorită posibilității de recoltare în mod steril pe care o oferă. Produsul recoltat se introduce în eprubete sterile, unde se poate păstra pentru efectuarea examenelor directe și a însămânșărilor pe medii de cultură adecvate.

Lichidele pleurale se recoltează cu instrumentar steril în pahare sau eprubete sterile, din care se fac apoi însămânșări și examene directe.

Urina este recoltată de la femei cu sonda "Nélaton" sterilă, iar de la bărbați fără

sondaj, lăsând să se scurgă un prim jet, și recoltând apoi jetul următor în eprubete sterile. Examenul acestor produse trebuie făcut în scurt timp.

Materiile fecale, reprezentând scaunul emis normal, fără purgativ sau laxativ, sunt controlate în prealabil pentru a observa striurile de mucozități, care vor fi recoltate și examinate separat. În cazul în care nu există elemente patologice (mucozități, striuri mucosanguinolente etc.) se ia o porțiune mică de fecale, cu ajutorul unei baghete de sticlă plină - sterilă, și se introduce într-o eprubetă în care în prealabil s-a dizolvat penicilină 5 000 U/ml în ser fiziologic.

Puroiul este recoltat prin punctii, cu ace având diametrul mare, în seringi sterilizate, sau cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile din leziuni deschise. Produsul este trimis la laborator, de preferat în seringă cu care a fost recoltat sau într-o eprubetă sterilă și închisă ermetic.

Sângele pentru hemacultură este recoltat prin puncție venoasă și înșămăntat pe mediul Sabouraud lichid în proporție de 1/50. Se incubează la 37°C și apoi se efectuează mai multe treceri pe medii Sabouraud solid în care s-au incorporat antibiotice (penicilină, streptomycină sau cloramfenicol).

Pielea capului, regiunea păroasă a feței sau pielea glabră pot fi suspectate de afecțiuni micotice. Pentru precizarea diagnosticului, în zonele afectate se recoltează peri suspecti de a fi paraziți, recoltând peri de la marginea leziunilor, acolo unde se află zona de maximă extensiune a ciupercii, cu ajutorul unei pense depilatorii sterile sau cu ajutorul unui ac flambat.

În cazul în care peri recoltați nu sunt examinați imediat, ei sunt așezați între două lame de sticlă șlefuită, până la examinare (examinare directă sau înșămăntări).

Scuamele se vor recolta de la periferia leziunilor prin raclare cu ajutorul unei mici chiurete sau a unui vaccinostil, ori, în lipsă, cu ajutorul unei lame de sticlă șlefuită. Materialul recoltat în cazul în care nu este examinat imediat va fi păstrat între două lame de sticlă.

Unghiile constituie un material biologic în care elementele fungice sunt de cele mai multe ori greu de pus în evidență. Recoltarea trebuie să se facă din partea modificată a unghiei, acolo unde prezintă îngroșări, unde marginile libere sau laterale sunt dezlipite de patul unghiei, având sub el un depozit sfărâmițos. Acest depozit este recoltat cu ajutorul unei chiurete sau al unei lanțete, raclând din profunzime, deoarece straturile superficiale sunt, de regulă, suprainfectate cu germeni saprofiti. În cazul în care examenele sunt negative, se mai poate recomanda și tăierea mai multor porțiuni mici din lama unghiulară, care se fierb 1/2-1 oră în soluție de hidroxid de potasiu 10%, până la macerare, și apoi se examinează la microscop.

Instrumentele cu care se face recoltarea materialului patologic sunt, de regulă, instrumente metalice, pense de epilare, lanțete, ace de corp străin, anse de platină, pense de iris curbe, seringi de 2-5 ml. Sterilizarea instrumentarului necesar pentru recoltare se face prin fierbere în clocot timp de 30 min. Pentru a se asigura o bună recoltare, trebuie respectat în toate cazurile locul de recoltă; zona se alege cu grijă, în raport cu tipul de ciupercă și de leziune.

Cercetare, micologică a materialului patologic recoltat se face fie prin examenul microscopic direct al produsului patologic recoltat, efectuat extemporaneu, după fixare în soluție de potasă caustică 40%, sau lactofenol, fie prin metode de cultivare a ciupercilor pe medii de cultură.

Aceste două categorii de metode de diagnostic sunt completate în unele cazuri cu reacții imunobiologice (seroreacții, IDR) și cu inoculări de produse patologice la animalele receptive.

Examenul direct al produsului patologic reprezintă procedeu care ne dă, în majoritatea cazurilor, un diagnostic de orientare imediată. El constă în examinarea între lamă și lamelă a produsului patologic disociat în prealabil într-o picătură dintr-o soluție de lactofenol, cloral-lactofenol, soluție Lügol.

Pentru a fi concludent, examenul direct poate fi completat cu examenul preparatelor colorate cu albastru de metilen, colorație Gram sau cu colorații selective.

Diagnosticul prin culturi. Examenul direct al produsului patologic este acela care precizează natura micotică a unei afecțiuni. Precizarea speciei de ciupercă patogenă se face numai prin cultivarea paraziților pe medii selective.

— Mediile de cultură folosite în acest scop, în micologie, pot fi grupate în două mari categorii: medii de izolare, pe care ciupercile sunt trecute din viața parazită în viața saprofită, și medii de probă, destinate dezvoltării caracterelor morfologice tipice ale ciupercii izolate, precizând astfel specia respectivă.

Dintre mediile uzuale, cităm: mediul Sabouraud, mediul Czapek, Raulin, Gorodkova, iar dintre mediile speciale: mediul mălai-agar, orez-bilă, mediul Nikerson ș.a. Testele de fermentare completează lista mediilor în care, pe baza caracterelor morfologice, se identifică speciile de ciuperci.

Diagnosticul imunobiologic al unor micoze constă în evidențierea anticorpilor specifici din serul bolnavului prin reacții de precipitare, aglutinare, fixare de complement, la care se adaugă tehnica recentă de evidențiere a anticorpilor fluorescenți. Intradermoreacția cu antigen specific este o altă metodă de diagnostic, dar insuficient de precisă.

Inocularea la animalul de laborator reprezintă metoda de diagnostic utilizată în aprecierea patogenității unei specii izolate din leziuni micotice. Animalele de elecție sunt șoarecele alb sau cobaiul. În diagnosticul infecțiilor cu *Candida albicans*, inoculările se fac pe suprafața pielii în prealabil depilată, cu citire la 5-7 zile la cobai, sau intravenos la șoarece alb. În aceste ultime cazuri, inoculările pozitive produc moartea animalului în 3-5 zile.

Antifungigrama reprezintă metoda prin care se încearcă în laborator, pe medii de cultură favorabile, aprecierea acțiunii fungistatice sau fungicide a unui antifungic sau chimioterapic pentru stabilirea indicațiilor de tratament. Ea se realizează plasând pe mediul selectiv înșămăntat cu ciupercă de cercetat rondelă de hârtie de filtru îmbibată în soluții de diferite concentrații din substanțele de cercetat și citind la 1-3 zile puterea antifungică a acestor substanțe, pe baza diametrului ariei de inhibiție a dezvoltării ciupercilor.